

ÉTUDE DE LA RELATION STRUCTURE-PERMÉABILITÉ DE MACROCYCLES SEMI-PEPTIDIQUES

par

Christian Comeau

Mémoire présenté au Département de chimie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, janvier 2018

Le 24 janvier 2018

*le jury a accepté le mémoire de Monsieur Christian Comeau
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Éric Marsault
Directeur de recherche
Département de pharmacologie-physiologie

Professeur Marc Labelle
Évaluateur interne
Département de chimie

Professeur Yves Dory
Évaluateur interne et président-rapporteur
Département de chimie

SOMMAIRE

Le développement de médicaments de nature peptidique est principalement limité par une faible biodisponibilité orale. La macrocyclisation a été identifiée comme une solution possible à certains problèmes de métabolisme, mais une basse perméabilité constitue souvent le facteur limitant. Pourtant, certains macrocycles, dont la cyclosporine, parviennent à traverser les membranes. À l'heure actuelle, alors que la perméabilité de grands macrocycles peptidiques fait l'objet de nombreuses études, celle des macrocycles semi-peptidiques demeure peu explorée. Afin de mieux comprendre la relation structure-perméabilité des macrocycles peptidiques et semi-peptidiques, une librairie de 36 composés a été synthétisée en incorporant de façon systématique deux modifications structurales ciblant l'aspect conformationnel : 1) le remplacement de résidus peptidiques par des résidus peptoïdiques et 2) l'utilisation de différents chaînons chiraux. Ces composés ont été testés dans des essais de perméabilité et les résultats obtenus couvrent une grande plage de valeurs. Une de ces modifications a apporté une hausse importante de la perméabilité dans la majorité des cas.

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier mon directeur de recherche Éric Marsault chez qui j'ai eu l'occasion de faire deux stages lors de mon baccalauréat, puis de compléter ce projet de maîtrise. Son support constant, son amabilité et l'importance qu'il accorde à l'apprentissage continu font de lui un professeur idéal pour un étudiant gradué.

J'aimerais également remercier les gens avec lesquels j'ai eu l'occasion de collaborer pour ce projet, notamment le professeur Grégoire Leclair de l'Université de Montréal pour son aide dans l'élaboration des tests de perméabilité et toute son équipe. Un merci particulier à son assistante de recherche Rabeb Mouna Derbali, responsable de l'essai Caco-2.

Tous mes remerciements aux Pr. Yves Dory et Pr. Marc Labelle pour avoir accepté la révision de ce mémoire et à Jean-Marc Chapuzet pour avoir eu la patience de répondre à toutes mes questions et pour son aide concernant tous l'aspect administratif.

Je tiens aussi à remercier mes collègues de travail qui enrichissent mon quotidien et qui forment une source précieuse de conseils. Je remercie particulièrement mon stagiaire Sylvain Poulet pour son excellent travail.

Finalement, merci à Annie Doucet pour son aide avec les systèmes analytiques, à Luc Tremblay, notre spécialiste RMN et aux organismes subventionnaires CRSNG et FCI pour leur soutien financier.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	I
REMERCIEMENTS	II
TABLE DES MATIERES	III
LISTE DES ABREVIATIONS	V
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES ÉQUATIONS	XIII
LISTE DES SCHEMAS	XIV
INTRODUCTION	1
I.1 La biodisponibilité orale	1
I.2 La mesure de la perméabilité	8
I.2.1. L'essai PAMPA	12
I.2.2. L'essai Caco-2	13
I.3 L'intérêt des macrocycles	14
I.3.1. Les peptides comme agents thérapeutiques	15
I.3.2. La restriction conformationnelle	18
I.3.3. Avantages pharmacodynamiques des macrocycles	19
I.3.4. Avantages pharmacocinétiques des macrocycles	26
I.3.5. Macrocycles semi-peptidiques	29
I.4 Description du projet	30
I.4.1. But et hypothèses	30
I.4.2. Design	30
I.5 Approche rétrosynthétique	33
I.5.1 Hydrogénation asymétrique	33
I.5.2. Méthyle en position 2	34
I.5.3. Méthyle en positions 3 et 4	34
I.5.4. Méthyle en position 5	35
I.5.5. Phase solide	36
I.5.6. Macrocyclisation	38

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE.....	40
II.1 Synthèse des chaînons.....	40
II.1.1 Hydrogénation asymétrique.....	40
II.1.2 Chaînon méthylé en position 2	42
II.1.3 Chaînon méthylé en position 3	43
II.1.4 Chaînon méthylé en position 4	46
II.1.5 Chaînon méthylé en position 5	47
II.2 Synthèse des précurseurs linéaires sur phase solide	48
II.2.1. Macrocyclisation et purification.....	50
CHAPITRE 2 : TESTS DE PERMEABILITE	53
III.1. PAMPA.....	53
III.1.1. Premier essai à Montréal	53
III.1.2. Essais à Sherbrooke et optimisation.....	55
III.1.3. Deux hypothèses concernant les peptoïdes	62
III.2 Caco-2.....	63
III.3 Analyse conformationnelle RMN.....	70
CONCLUSION GENERALE	80
REFERENCES ET NOTES	81
ANNEXE 1 : PARTIE EXPERIMENTALE	90
Remarques générales	91
Modes opératoires.....	93
ANNEXE 2 : SPECTRES DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DES PROTONS.....	125
ANNEXE 3 : SPECTRES UPLC-MS.....	288

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide aminé
Ac	Acétyle
ACN	Acétonitrile
BINAP	2,2'-Bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphtyle
Bn	Benzyle
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyle
Bu	Butyle
Cl	Clairance
cLogP	LogP calculé
CSA	Cyclosporine A
CYP	Cytochrome P450
DCM	Dichlorométhane
DEPBT	3-(diéthoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one
DIBAL	Hydruure de diisobutylaluminium
DIC	Diisopropylcarbodiimide
DMAP	4,4-Diméthylaminopyridine
DMF	N,N-Diméthylformamide
DMP	1,1,1-triacétoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-one
DMS	Sulfate de diméthyle
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPA	Azoture de diphénylphosphoryle
EC ₅₀	Concentration efficace médiane
ee	Excès énantiomérique
Et	Éthyle
F%	Biodisponibilité orale
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine, par extension : fluorescéine
Fmoc	Fluorénylméthyloxycarbonyle
GP	Groupe partant
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G

HOBt	Hydroxybenzotriazole
HOObt	1,2,3-Benzotriazin-4(3H)-one
HPLC	Chromatographie en phase liquide haute-performante
i.p.	Administration intrapéritonéale
i.v.	Administration intraveineuse
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
IPP	Interaction protéine-protéine
IPS	Institut de pharmacologie de Sherbrooke
K_d	Constante de dissociation
KHMDS	Bis(triméthylsilyl)amidure de potassium
K_i	Constante d'inhibition
LE-MDCK	Cellules Madin-Darby canine kidney Low Efflux
LiHMDS	Bis(triméthylsilyl)amidure de lithium
logD	Logarithme du coefficient de partition entre l'eau à un pH donné et le 1-octanol
logP	Logarithme du coefficient de partition eau / 1-octanol
MDCK	Cellules Madin-Darby canine kidney
Me	Méthyle
MW	Poids moléculaire
NaHMDS	Bis(triméthylsilyl)amidure de sodium
ND	Non déterminé
ns	Non significatif
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
P_{app}	Perméabilité apparente
PDC	Dichromate de pyridinium
P_e	Perméabilité effective
Pgp	P-glycoprotéine
Ph	Phényle
p.o.	Administration orale
PSA	Surface polaire
psi	Livre-force par pouce carré
RMN	Résonance magnétique nucléaire

s.c.	Administration sous-cutanée
SSE	Somme des erreurs au carré
TEER	Résistance électrique transépithéliale
TEMPO	(2,2,6,6-Tétraméthylpipéridin-1-yl)oxy
Tf	Triflate
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
tPSA	Surface polaire topologique
UPLC-MS	Chromatographie en phase liquide ultra-performante couplée à un spectromètre de masse
UV	Ultraviolet, par extension : ultraviolet-visible
V _d	Volume de distribution
X _c	Auxiliaire chiral

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	6
Tableau 2	7
Tableau 3	10
Tableau 4	14
Tableau 5	19
Tableau 6	23
Tableau 7	29
Tableau 8	60
Tableau 9	67
Tableau 10	72
Tableau 11	76
Tableau 12	77
Tableau 13	78

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Biodisponibilité orale.....	2
Figure 2 : Absorption par voie orale. PGP : glycoprotéine P ; CYP : cytochromes.	4
Figure 3 : Principaux modes de transport au travers l'épithélium intestinal ¹⁴ et exemples de médicaments perméants passivement (propranolol ¹⁹), par transport actif (zidovudine ²⁰ , érythromycine ²¹) et par voie paracellulaire (aténolol ²²). Une description plus détaillée de ces composés se trouve au Tableau 4.	5
Figure 4 : Structure des plaques pour les tests de perméabilité	9
Figure 5 : Deux composés de référence pour la mesure de perméabilité. Ces valeurs ont été mesurées à pH = 7.4 ⁶²	12
Figure 6 : (haut) Intérêt croissant des macrocycles, basé sur une recherche des termes « <i>macrocycle</i> + <i>drug</i> » et « <i>drug</i> » sur SciFinder. (bas) Deux exemples de composés macrocycliques approuvés par la FDA.	15
Figure 7 : Bioisostères d'amide.....	17
Figure 8 : Comparaison entre peptide et peptotide.....	17
Figure 9 : Équilibre <i>cis-trans</i>	18
Figure 10 : Équilibre conformationnel du méthylcyclohexane.....	18
Figure 11 : Arrangement d'un peptide en (gauche) feuillet β et en (droite) tournants α , β et γ ¹³⁷	21
Figure 12 : (gauche) Superposition d'un bicycle mimant un feuillet β sur la conformation liée au récepteur de 12 inhibiteur de HIV-1. (droite) La trajectoire de dynamique moléculaire montre que les liens reliant les deux cycles sont très flexibles, mais que les cycles demeurent relativement rigides. ¹⁴³	22
Figure 13 : Comparaison d'efficacité entre deux composés inhibant la protéase NS3 du virus de l'hépatite C. ¹⁵²	23
Figure 14 : Résultats du groupe de Verdine sur l'inhibition du complexe β -catéine/TCF4 à l'aide de peptides agrafés en hélices α . ¹⁵⁵ (A) Procédé de macrocyclisation par métathèse croisée. (B) Courbes de dichroïsme circulaire utilisées pour caractériser la structure secondaire. (C) Séquence des composés, niveau d'hélicité et constantes d'affinité.....	24
Figure 15 : Cyclosporine	25
Figure 16 : Mécanisme d'action de la cyclosporine (CsA) et du tacrolimus (FK506) ¹⁶³	25
Figure 17 : Différents modes de macrocyclisation d'un peptide.	26

Figure 18 : Modèle proposé par Lokey <i>et al.</i>	27
Figure 19 : Effet de différentes substitutions d'un acide aminé par un peptoïde sur la perméabilité apparente de cellules MDCK-LE. ¹⁷²	28
Figure 20 : Sélection de macrocycles semi-peptidiques agonistes de la ghréline. ¹⁷⁵	29
Figure 21 : Description graphique des modifications envisagées.	31
Figure 22 : Liste des neuf chaînons sélectionnés	32
Figure 23 : Description de la librairie, incluant 2 exemples décrivant la nomenclature choisie	32
Figure 24 : Rétrosynthèse par hydrogénation asymétrique de Noyori.....	34
Figure 25 : Rétrosynthèse des chaînons 2-Me	34
Figure 26 : Rétrosynthèse des chaînons 3-Me et 4-Me. Pour simplifier la figure, seule la rétrosynthèse d'une des deux paires d'énantiomères est montrée.	35
Figure 27 : Rétrosynthèse des chaînons 5-Me. Pour simplifier la figure, seule la rétrosynthèse d'une des deux paires d'énantiomères est montrée.	36
Figure 28 : Résine de Wang	36
Figure 29 : Synthèse sur phase solide	37
Figure 30 : Deux méthodes d'incorporation de peptoïdes sur support solide.....	38
Figure 31 : Mécanisme d'épimérisation d'un fragment comprenant un ester activé.	39
Figure 32 : Relation entre pression et résultats obtenus.....	41
Figure 33 : Le peptoïde de l'alanine est la sarcosine.	48
Figure 34 : Formation de dicétopipérazine lors de la déprotection.	49
Figure 35 : Résine 2-chloro-chlorotrityl.....	49
Figure 36 : Mécanisme de couplage avec DEPBT. ²³⁴	50
Figure 37 : Ensemble des macrocycles synthétisés.....	52
Figure 38 : (gauche) Droite dose-réponse du composé Ø-Ø (droite). La solution a été analysée tout juste après dilution dans le tampon phosphate (t = 0), puis après 72 h à -86 °C et 72 h à 23 °C. Des écarts significatifs apparaissent en dessous de 10 nM, car le pic obtenu est très faible et son intégration inexacte.	53
Figure 39 : (gauche) Premier essai PAMPA – Montréal. Voir le texte pour une description des composés « reg-6 » et « alt-6 ». (droite) Balance massique du premier essai PAMPA. Une variation de 15 % est généralement considérée comme acceptable.....	54

Figure 40 : Comparaison des perméabilités PAMPA obtenues pour quatre composés lors de différents tests. Chaque composé a été testé en triplicata et certains points se superposent. Voir le texte pour une description des différentes expériences.	56
Figure 41 : Balance massique de l'essai PAMPA obtenue pour quatre composés lors des différents tests. Voir le texte pour une description des différentes expériences.	56
Figure 42 : Essai PAMPA sur les 41 composés, en ordre croissant. Les composés de référence sont représentés en couleur et le macrocycle ne contenant aucun peptoïde et aucun méthyle en noir et blanc.	58
Figure 43 : Heat map PAMPA : La teinte vers le rouge signifie une perméabilité plus élevée. Les valeurs moyennes pour chacun des composés ont été utilisées.	58
Figure 44 : Balance massique. La majeure partie des composés se situe légèrement sous la zone généralement considérée comme acceptable.	59
Figure 45 : Effets des modifications structurales sur la perméabilité passive (PAMPA). ns : $P > 0.05$; * : $P \leq 0.05$; **** : $P \leq 0.0001$	61
Figure 46 : Comparaison entre perméabilité en PAMPA et (gauche) cLogP (droite) temps de rétention.	61
Figure 47 : Deux hypothèses pour expliquer les meilleures perméabilités observées avec Nleu.	62
Figure 48 : Essai PAMPA des composés 70 (HypA) et 71 (HypB)	63
Figure 49 : Perméabilité apparente en cellules Caco-2 (A→B), en ordre décroissant.	64
Figure 50 : Heat map Caco-2 (A→B) : La teinte vers le rouge signifie une perméabilité plus élevée. Les valeurs moyennes pour chacun des composés ont été utilisées.	64
Figure 51 : Perméabilité apparente en cellules Caco-2 (B→A), en ordre décroissant.	65
Figure 52 : Heat map Caco-2 (B→A) : La teinte vers le rouge signifie une perméabilité plus élevée. Les valeurs moyennes pour chacun des composés ont été utilisées.	66
Figure 53 : Heat map de l'efflux Caco-2 mesuré par le ratio BA/AB : La teinte vers le rouge signifie un efflux plus élevé, avec une valeur limite posée à 50 pour mieux voir les valeurs plus faibles. Les moyennes ont été utilisées.	66
Figure 54 : Comparaison des perméabilités PAMPA et Caco-2.	69
Figure 55 : Absence de forte corrélation entre les perméabilités en Caco-2 et en PAMPA.	69
Figure 56 : Comparaison de Nleu-5R et Nleu-5S	70
Figure 57 : Série 2S	71
Figure 58 : Amides exposés au solvant (en rouge)	73

Figure 59 : Comparaison entre différences de déplacement et perméabilité	77
--	----

LISTE DES ÉQUATIONS

Équation 1 10

Équation 2 20

Équation 3 20

Équation 4 20

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 1 : Synthèse du chaînon substitué en position 2 par hydrogénation asymétrique.	40
Schéma 2 : Essai de séparation par formation de diastéréoisomères.	42
Schéma 3: Synthèse du chaînon substitué en position 2 par oxazolidinone.	42
Schéma 4 : Synthèse du chaînon substitué en position 3.	43
Schéma 5 : Réaction secondaire possible de type Prins.	45
Schéma 6 : Synthèse de 4-Me.	46
Schéma 7 : Synthèse du chaînon méthylé en position 5.	47

INTRODUCTION

I.1 La biodisponibilité orale

Dans la majorité des cas, un médicament doit être administrable par voie orale pour connaître un succès commercial. C'est le mode d'administration le mieux toléré par les patients, car non invasif et simple d'application. À l'opposé, l'administration intraveineuse requiert l'intervention de personnel médical ou de dextérité de la part du patient, est difficile à supporter pour le patient – particulièrement dans le cas de doses fréquentes – et est associée à des coûts élevés.¹ Pourtant, d'un point de vue de la pharmacocinétique, l'injection directe dans le système sanguin est avantageuse. La concentration du médicament dans le sang peut être contrôlée avec précision, car le principe actif n'a pas de membranes à traverser pour se rendre dans la circulation sanguine ni à subir les différentes étapes de métabolisme pré-systémique associées au système digestif et au foie; par conséquent, 100 % de la dose administrée par voie intraveineuse se retrouve dans la circulation, ce qui n'est pas le cas des autres voies d'administration.

Les courbes pharmacocinétiques (Figure 1) représentent la concentration sanguine en fonction du temps. La courbe en rouge correspond à une injection intraveineuse modèle : la concentration sanguine initiale est maximale, et diminue au fur et à mesure que le médicament est distribué dans l'organisme, métabolisé et/ou excrété. La courbe en bleu représente un médicament administré oralement (p.o., *per os*). À l'opposé de l'administration intraveineuse, la concentration initiale est nulle, car le passage à travers le système digestif et le foie prend un certain temps. Malgré ce décalage, un médicament oral « idéal » se retrouve entièrement dans la circulation sanguine. Afin de quantifier le degré de passage dans le sang, on utilise la biodisponibilité orale.² Il s'agit d'un pourcentage, déterminé en comparant deux modes d'administrations : oral et intraveineux, puis en observant la concentration sanguine en fonction du temps de chacun. La biodisponibilité orale est le rapport entre les deux aires sous la courbe. Une biodisponibilité inférieure à 100 % signifie que seule une fraction du médicament a été absorbée et/ou qu'une partie a été métabolisée avant d'atteindre la circulation sanguine.

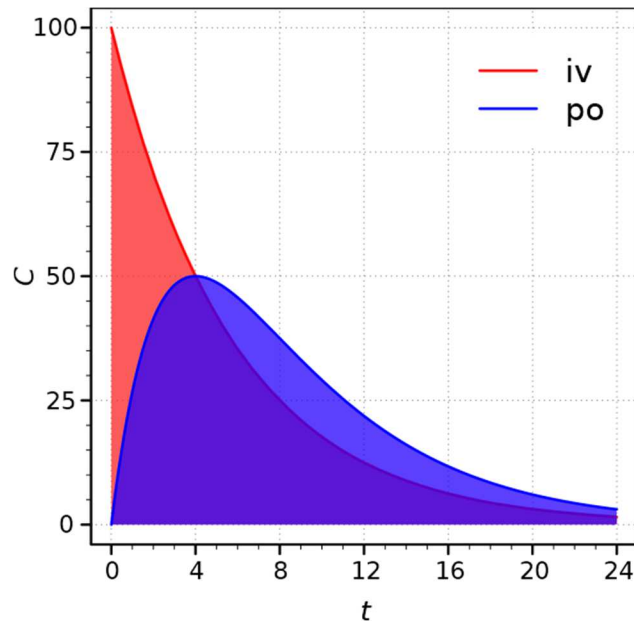


Figure 1 : Biodisponibilité orale

Les deux courbes déclinent en fonction du temps, car le médicament disparaît de la circulation par trois mécanismes : (1) il se distribue dans différents organes et tissus, (2) est métabolisé et/ou (3) est excrété.³ Le volume de distribution (V_d) est couramment utilisé pour quantifier le premier mécanisme. Il s'agit du volume théorique dans lequel le médicament semble être dissous suivant l'injection pour atteindre la concentration circulante. Un médicament se distribuant rapidement dans le tissu adipeux, par exemple, aura une concentration sanguine plus faible et par conséquent un V_d très élevé. C'est le cas de la chloroquine qui montre un volume de distribution de plus de 15 000 L, bien que le volume de sang soit approximativement 8 % du poids chez l'humain (environ 5 L pour un poids moyen).^{4,5} Tenant compte à la fois de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion, la clairance (Cl) décrit la vitesse de disparition du composé d'un volume donné de sang.³ Plus exactement, elle est définie par le volume de sang « vidé » du médicament par unité de temps. On distingue différentes clairances selon les organes (*e.g.* clairance rénale, clairance hépatique, etc.) et leur somme est la clairance totale (Cl_{TOT}).

Plusieurs facteurs peuvent limiter la biodisponibilité orale^{3,6} :

- l'état du système digestif (à jeun vs postprandial)
- la solubilité et la cinétique de dissolution du médicament
- la stabilité chimique du principe actif
- la motilité gastro-intestinale
- le débit sanguin splanchnique (débit au niveau de l'abdomen)
- la perméabilité des cellules épithéliales envers le médicament
- l'ionisation du médicament aux différents pH physiologiques
- le métabolisme de premier passage (aussi connu comme métabolisme pré-systémique).

Parmi les facteurs associés à la nature même du principe actif, la solubilité, la stabilité et l'ionisation sont relativement simples à optimiser en variant la structure et particulièrement l'équilibre entre fonctions polaires et apolaires. Par contre, la perméabilité et le métabolisme de premier passage sont notoirement difficiles à prédire et constituent encore des défis dans la conception de médicaments oraux.⁷ En ce qui concerne la perméabilité, il faut noter que la majorité des médicaments administrés par voie orale sont absorbés au niveau du petit intestin.⁸ L'épithélium intestinal y est replié en villosités et microvillosités de façon à générer une grande surface exposée d'environ 30 m², et ce repliement est particulièrement important dans le petit intestin.⁹ Les cellules constituant la paroi intestinale (entérocytes) forment une monocouche et sont polarisées, c'est-à-dire qu'elles expriment des protéines différentes sur la paroi exposée à la lumière intestinale (côté apical ou luminal) et la paroi rattachée au système de la veine porte (côté basolatéral ou sérique).¹⁰

Dans le parcours du médicament dans le système digestif, la digestion à l'intérieur de l'estomac constitue une première étape de métabolisme en raison de la présence d'enzymes digestives et d'un pH acide.^{11,12} La sortie de l'estomac vers le petit intestin est l'étape suivante (Figure 2), où le médicament entre en contact avec les entérocytes et peut y être absorbé. Bien qu'une certaine proportion des médicaments, particulièrement les acides, soient absorbés au niveau de l'estomac, nous nous concentrerons dans ce mémoire sur l'absorption intestinale.¹³

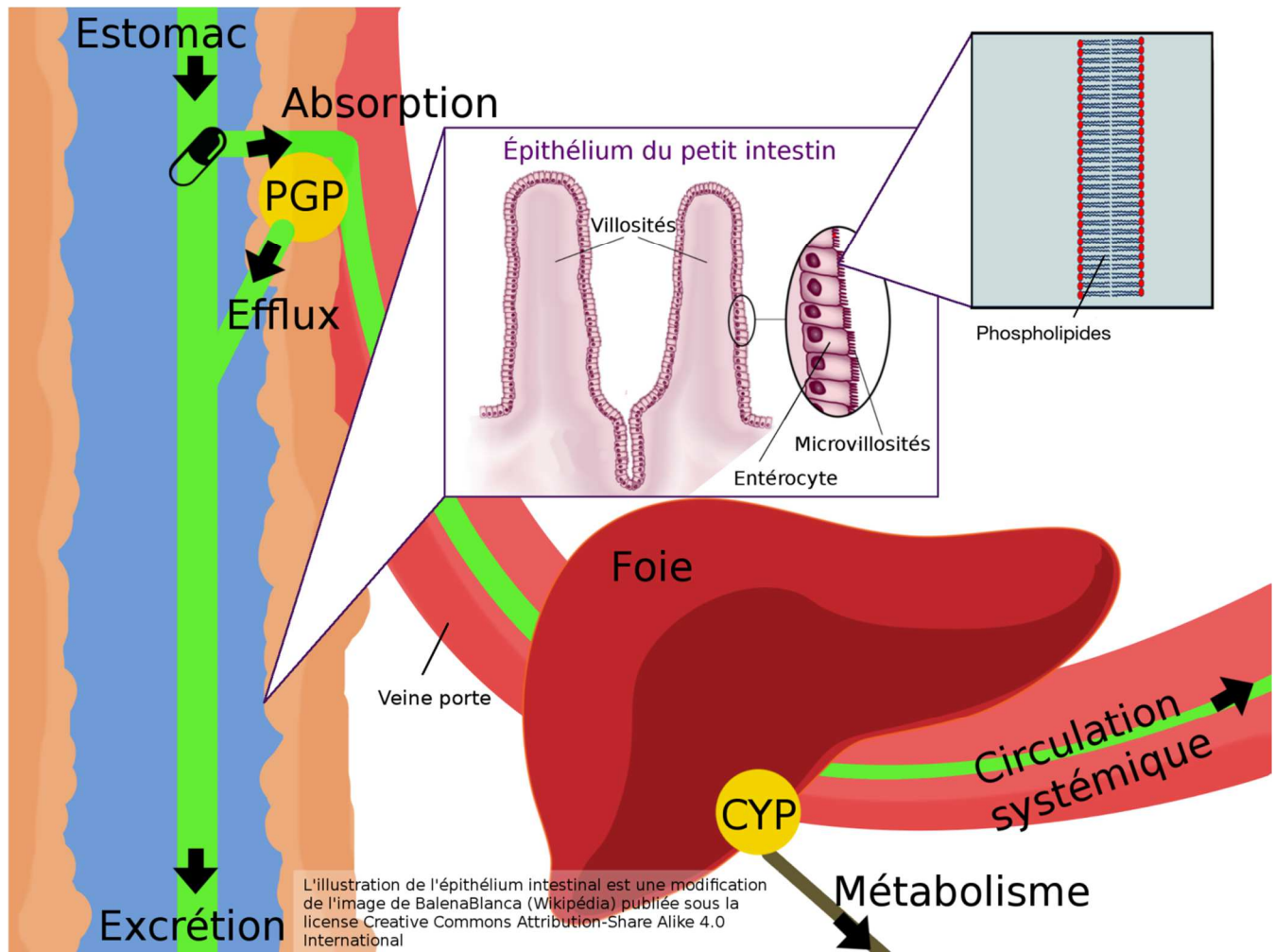


Figure 2 : Absorption par voie orale. PGP : glycoprotéine P ; CYP : cytochromes P450.

Il existe plusieurs chemins possibles à travers l'épithélium intestinal (Figure 3).¹⁴ D'abord, de très petites molécules peuvent passer à travers la jonction cellulaire, soit entre deux cellules (voie paracellulaire). Pour les molécules de taille plus importante, le passage direct à travers la membrane (voie transcellulaire) est souvent décrit comme le chemin le plus fréquent⁶, bien qu'il ait été plusieurs fois soulevé que ce transport pourrait être dû à des effecteurs encore non identifiés.^{14,15} Il s'agit dans les deux cas de transport dit « passif » puisqu'il n'implique pas d'énergie de la cellule. Enfin, dans les autres cas, les molécules peuvent passer la membrane cellulaire grâce à des transporteurs, qui peuvent avoir deux rôles opposés : le médicament peut être reconnu à la surface de la cellule et être transporté à l'intérieur de celle-ci (*uptake*); le cas inverse est également possible, où certaines protéines transmembranaires – notamment la glycoprotéine P (Pgp) – reconnaissent une gamme de molécules, entre autres une proportion des molécules exogènes comme certains médicaments (xénobiotiques) et les transportent vers dans la lumière intestinale (efflux).¹⁶⁻¹⁸

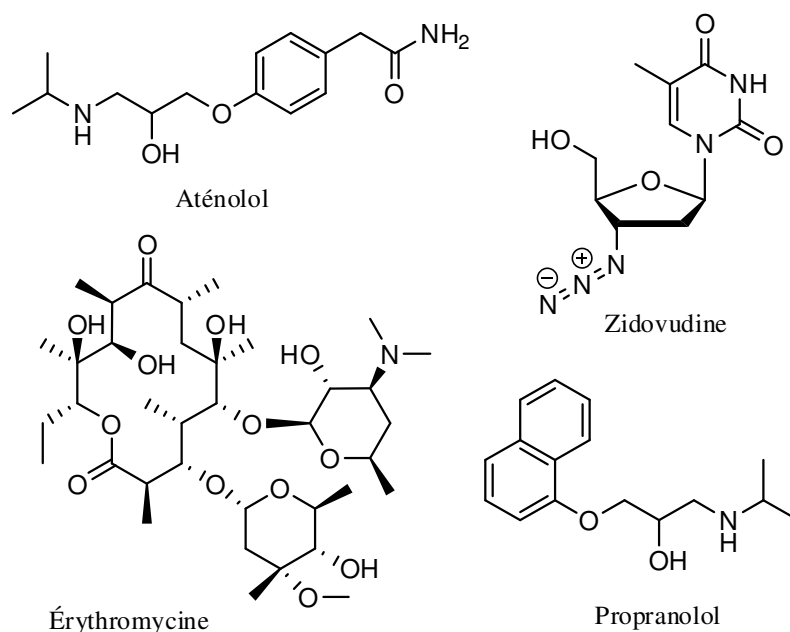
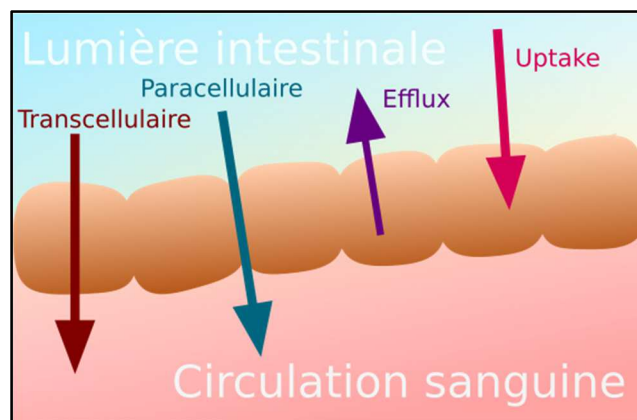


Figure 3 : Principaux modes de transport au travers l'épithélium intestinal¹⁴ et exemples de médicaments perméants par voie transcellulaire (propranolol¹⁹), par transport actif (zidovudine²⁰, érythromycine²¹) et par voie paracellulaire (aténolol²²). Une description plus détaillée de ces composés se trouve au Tableau 4.

Une deuxième barrière à la biodisponibilité orale est le métabolisme de premier passage. En effet, en plus de la métabolisation qui peut avoir lieu dans l'estomac et dans l'intestin, les médicaments qui atteignent la veine porte doivent passer en premier lieu par le foie avant d'entrer dans la circulation systémique.^{3,23} À l'intérieur des cellules du foie (hépatocytes), on retrouve plusieurs enzymes pouvant effectuer diverses

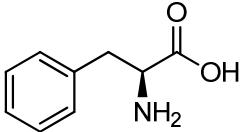
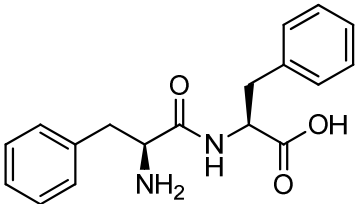
transformations chimiques sur le médicament, principalement d'oxydation (réalisées par les cytochromes P450) et de conjugaison à des groupements polaires facilitant l'excrétion.^{2,3,24,25} Ceci mène non seulement à une diminution de la concentration sanguine du médicament non métabolisé, mais aussi à la formation de métabolites potentiellement toxiques ou ayant des effets physiologiques indésirables.²⁶⁻²⁹ Certaines prodrogues utilisent d'ailleurs cette stratégie, dans laquelle c'est le métabolite qui a l'activité thérapeutique désirée.³⁰⁻³² Comme les hépatocytes sont des cellules au même titre que les entérocytes, la perméabilité du médicament à travers la double couche lipidique influence le degré de métabolisation.³³ Une molécule perméante par diffusion passive le sera également au niveau des hépatocytes et subira davantage l'effet du métabolisme de premier passage, c'est l'une des raisons pour lesquelles les molécules les plus lipophiles se font métaboliser de façon plus extensive que les molécules plus hydrophiles.³⁴⁻³⁷

L'ensemble de ces facteurs fait en sorte que dans la conception d'un médicament oral, les propriétés pharmacocinétiques sont les plus difficiles à modéliser. L'optimisation d'un paramètre (*e.g.* perméabilité) peut souvent nuire à un autre (*e.g.* solubilité, métabolisme, clairance, etc.). Pour rationaliser partiellement les modifications à effectuer, une analyse statistique des médicaments oraux sur le marché a permis l'établissement de critères désormais célèbres : les règles de Lipinski.³⁸ Il s'agit de quatre facteurs communs à la majorité des médicaments oraux (Tableau 1). Le nombre de donneurs de ponts H est estimé par la somme des fonctions comprenant un lien O-H ou N-H, les accepteurs par la somme des atomes d'azote et d'oxygène, et le logP correspond au logarithme du coefficient de partition entre l'eau et le 1-octanol.³⁸

Tableau 1	
Lipinski	Veber
Nb. donneurs ponts H ≤ 5	Nb. de liens libres ≤ 10
Nb. accepteurs ponts H ≤ 10	Nb. donneurs + accepteurs ponts H ≤ 12
Poids moléculaire ≤ 500	PSA $\leq 140 \text{ \AA}^2$
LogP ≤ 5	

Citée plus de 11 000 fois, cette étude a fait prendre conscience de l'importance des propriétés physico-chimiques dans le design d'un médicament.³⁹ Cinq ans plus tard, un article de Veber préconisait une approche alternative basée sur le nombre de liens libres (*rotatable bonds*), la somme des donneurs et

accepteurs de ponts H et la surface polaire totale (PSA).⁴⁰ Ce dernier paramètre se rapproche du coefficient de partition (logP) utilisé par Lipinski, mais alors que le logP décrit la préférence relative d'un composé entre un milieu hydrophile et un milieu lipophile, la PSA est une mesure additive des zones polaires, donc une valeur absolue. C'est-à-dire que plus une molécule contient de zones polaires, plus sa PSA sera élevée et ce peu importe le nombre ou l'étendue des zones lipophiles. Une molécule peut ainsi avoir à la fois une PSA élevée et un logP élevé (Tableau 2). Les peptides aliphatiques en sont de bons exemples, car ils contiennent à la fois des éléments polaires (lien peptidique) et des chaînes latérales non polaires. L'augmentation de nombre de résidus hydrophobes se traduit alors par une préférence de plus en plus forte pour une phase organique (cLogP) tout en présentant une surface polaire de plus en plus élevée.

Tableau 2		
Structure	cLogP	tPSA (Å ²)
 Phe	-1.56	63.3
 Phe-Phe	-0.25	92.42
Phe-Phe-Phe	0.91	121.52
Phe-Phe-Phe-Phe	2.07	150.62

Données obtenues par l'outil d'analyse de ChemDraw

Cette propriété additive de la PSA fait également en sorte que les molécules de haute masse molaire présentent typiquement des PSA élevées. La masse molaire est donc partiellement incluse dans cette mesure. Par ailleurs, il existe aussi la surface polaire topologique (tPSA), qui est une mesure couramment utilisée et parfois confondue avec la PSA, mais qui ne tient pas compte de l'aspect tridimensionnel. Contrairement à celle-ci, la PSA peut varier pour une même molécule selon sa conformation, certains groupements n'étant pas exposés au solvant. Ceci est particulièrement vrai pour de grosses molécules

comme les protéines, pouvant exposer ou masquer leurs groupements polaires en fonction de la polarité du solvant dans lequel on les étudie, et a également été observé par calcul avec de petites molécules.^{41,42} Le critère du nombre de liens libres suggère une meilleure biodisponibilité pour des molécules rigides et/ou plus petites. Tout comme la surface polaire, cette mesure comprend implicitement la masse moléculaire : plus une molécule comprend de liens, plus son nombre de liens libres tend à être élevé. Également, on peut remarquer que la PSA et le nombre de liens libres caractérisent des propriétés topologiques, ce qui n'est pas le cas des critères proposés par Lipinski.

I.2 La mesure de la perméabilité

La perméabilité est définie comme la quantité de molécules (mol) traversant une aire (cm^2) par unité de temps (s), selon un gradient de concentration donné ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$), ce qui signifie que les unités de la perméabilité sont des $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$, soit une vitesse.⁴³ Les tests de perméabilité les plus utilisés dans le domaine pharmaceutique sont les tests PAMPA (*Parallel artificial membrane permeability assay*)⁴⁴ et Caco-2.^{45–48} Le fonctionnement général de ces deux essais est similaire (Figure 4) : une solution tampon contenant le composé étudié est placée dans une plaque à 24 ou 96 puits, donneurs, dont le fond – perméable – a été recouvert d'une membrane semi-perméable (perméable aux molécules solubilisées mais pas aux cellules). Cette plaque est imbriquée dans une autre plaque du même nombre de puits, accepteurs, contenant seulement la solution tampon sans composé. Le montage est mis sous agitation à une température fixe et après un temps prédéterminé, les concentrations du composé dans les deux puits sont mesurées.⁴⁵ À partir de ces données, on peut calculer la perméabilité, qui correspond à la vitesse de passage à travers la membrane.

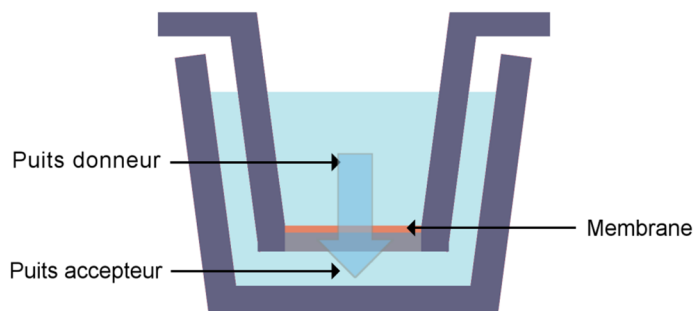


Figure 4 : Structure des plaques pour les tests de perméabilité

La différence entre les essais PAMPA et Caco-2 se situe donc au niveau du type de membrane utilisée : La membrane utilisée en PAMPA est constituée de lipides uniquement alors que celle utilisée en Caco-2 est une monocouche de cellules d'épithélium intestinal humain. Dans le premier cas, la membrane artificielle ne comprend aucune forme de transport actif (uptake, efflux), il s'agit simplement d'un film de matière visant à mimer la membrane biologique. On obtient donc uniquement une mesure de la perméabilité passive. L'essai Caco-2 quant à lui utilise une membrane constituée d'une monocouche cellulaire, afin de mieux mimer l'épithélium intestinal. Dans ce cas, la perméabilité observée est fonction du transport passif, du transport actif, du passage paracellulaire et du métabolisme.

Les principales différences entre les deux méthodes de mesure de la perméabilité sont résumées ci-dessous (Tableau 3). Vu la simplicité et le faible coût de l'essai PAMPA, il est souvent utilisé comme premier test, mais le test Caco-2 est souvent considéré comme plus proche de la réalité du petit intestin. Il y a toutefois un avantage à faire les deux essais pour un même composé : en ayant les deux résultats, on peut mieux évaluer l'importance des différents mécanismes de transport. Par exemple, une molécule montrant une perméabilité faible en PAMPA, mais haute en Caco-2 pourrait indiquer un transport actif.

Tableau 3

	PAMPA	Caco-2
Barrière	Phospholipides dans solvant	Monocouche de cellules épithéliales intestinales
pH	4-8	5.5-7.4
Mécanismes	Passif	Passif, actif, efflux, métabolisme
Composés / semaine	500	30
Coût / échantillon	<1\$	~30\$
Nb. personnes à temps plein	0.35	2

Ce tableau est adapté de « Drug-Like Properties : Concepts, Structure Design, and Methods from ADME to Toxicity Optimization »⁴⁵

La perméabilité apparente P_{app} est obtenue à partir de l'équation suivante^{49,50} :

Équation 1
$$C_A(t) = \left(\frac{M_{tot}}{V_D + V_A} \right) + \left(C_{A0} - \frac{M_{tot}}{V_D + V_A} \right) \times e^{-P_{app} \times A \times \left(\frac{1}{V_A} + \frac{1}{V_D} \right) \times t}$$

Les constantes V_D et V_A décrivent le volume des puits donneur et accepteur respectivement, l'aire A est celle du filtre et M_{tot} correspond au nombre de nanomoles présentes dans le système. Il s'agit d'une équation non linéaire pour laquelle on peut isoler P_{app} dans le cas où un seul point de mesure est pris, mais typiquement, plusieurs points de mesure sont pris. On procède par ajustement de courbe : une valeur de P_{app} est inventée et les concentrations résultantes aux différents temps de mesure sont comparées aux concentrations expérimentales. La somme des erreurs résiduelles au carré (SSE) est évaluée et la valeur de P_{app} progressivement modifiée jusqu'à obtenir une erreur stable, minimale.⁴⁹ De plus, il est nécessaire de tenir compte du volume soutiré à chaque point de mesure pour l'analyse. Cette équation tient compte du flux en direction inverse et il s'agit de la méthode de calcul suggérée par la revue sur l'essai Caco-2 de Nature Protocols.⁵⁰⁻⁵² Une méthode de calcul plus simple souvent rencontrée dans la littérature assume une condition de « free sink », c'est-à-dire que l'on suppose que le composé ne va que dans une seule direction, du puits donneur vers le puits accepteur.^{43,49} Or, si on laisse l'essai atteindre l'équilibre thermodynamique, les concentrations des deux compartiments deviendront éventuellement égales et la perméabilité observée sera nulle. La supposition de la condition free sink n'est donc valable que dans les cas où les perméabilités observées sont basses. En effet, la concentration du puits accepteur devrait

augmenter de façon non linéaire dans le temps, puisqu'à mesure que sa concentration augmente, la perméabilité en sens inverse (accepteur vers donneur) gagne en importance.

Afin d'assurer une certaine fiabilité, il est commun dans les tests de perméabilité de calculer la balance massique.^{43,50} Il s'agit du rapport entre la masse initiale de composé et la somme des masses retrouvées dans les deux compartiments. En théorie, ce rapport – exprimé en pourcentage – devrait être de 100 %. Cependant, certains composés peuvent adhérer aux parois de plastique ou se retrouver piégés dans la membrane ou dans les cellules, ou encore être métabolisés au niveau des entérocytes. On juge généralement acceptables les balances massiques ayant jusqu'à 15 % d'écart.^{53,54} Les perméabilités obtenues sont typiquement exprimées en $10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, bien que la mesure $\text{nm}\cdot\text{s}^{-1}$ soit également rencontrée dans la littérature. Dans l'analyse des résultats, il est souvent pratique de comparer les valeurs en logarithme (*i.e.* $-\log(P_{\text{app}})$).

I.2.1. L'essai PAMPA

L'essai PAMPA implique une membrane artificielle qui mime la double couche lipidique des cellules.⁴⁴ Pour ce faire, différentes formulations sont référencées dans la littérature, dont 1 % lécithine dans le dodécane, 2 % lécithine dans le dodécane, 10 % lécithine dans le dodécane, différents mélanges de phospholipides, uniquement de l'hexadécane, 5 % hexane dans l'hexadécane.^{51,55,56} De plus, le terme « lécithine » est assez vague et désigne le mélange de substances amphiphiles extraites de sources naturelles. Ce mélange est constitué principalement de phospholipides, qui sont la composante principale des membranes cellulaires.⁵⁷ Différents grades sont accessibles commercialement, qui correspondent à l'isolation avec un haut taux de pureté de certains phospholipides, notamment la phosphatidylcholine. Enfin, il subsiste une ambiguïté lors de la mise en place du test, quand on parle d'une « membrane », car généralement aucune caractérisation n'est faite et un mélange de mono-, bi- et multicouches lipidiques est possible.^{43,58}

Le pH des solutions tampons peut être choisi pour mimer différentes parties du système digestif et il est également possible d'utiliser des pH différents pour la plaque donneuse et la plaque acceptrice.^{43,45} La grande modularité fait de l'essai PAMPA sa force et sa faiblesse, puisqu'elle rend difficile la comparaison des valeurs absolues obtenues par différents groupes de recherche.⁵⁹ D'autres paramètres pouvant être modulés avec un grand impact sur la perméabilité observée sont par exemple la température, la vitesse d'agitation, l'épaisseur de la membrane utilisée et ces valeurs ne sont pas toujours toutes rapportées.^{43,60} Des composés de référence sont utilisés afin de mieux pouvoir comparer les résultats entre différentes expériences (Figure 5). Le vérapamil (grande perméabilité) et le furosémide (faible perméabilité) sont deux composés pouvant jouer ce rôle, car leur perméabilité a souvent été reportée dans différentes conditions.^{44,45,53,55,56,61,62}

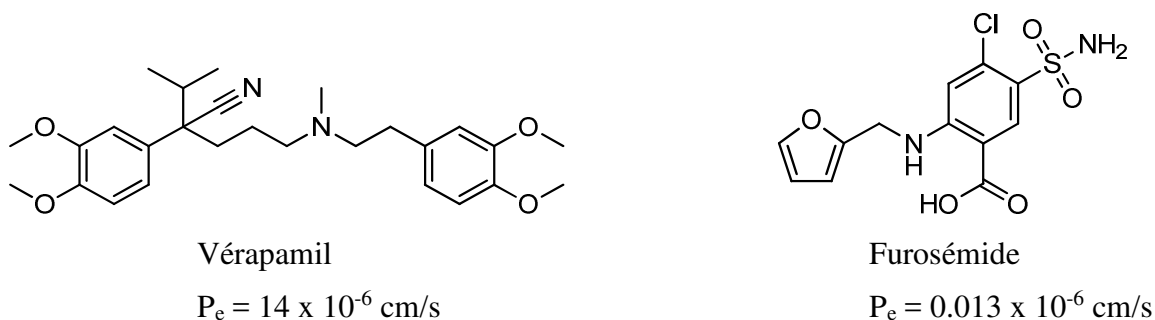


Figure 5 : Deux composés de référence pour la mesure de perméabilité. Ces valeurs ont été mesurées à pH = 7.4⁶²

I.2.2. L'essai Caco-2

Dans cet essai de perméabilité, on utilise comme membrane une monocouche de cellules épithéliales tumorales isolées du gros intestin (carcinomes de colon).⁶³ Ces cellules ont été cultivées de façon à leur donner un phénotype morphologique et fonctionnel se rapprochant des entérocytes du petit intestin et sont utilisées couramment pour l'évaluation de la perméabilité.^{45,46} Elles expriment différents transporteurs et protéases transmembranaires, notamment la Pgp.⁶⁴ Cela signifie que les composés étudiés dans l'essai Caco-2 peuvent être transportés activement vers l'intérieur de la cellule ou vers l'extérieur. Comme il s'agit d'une monocouche de cellules polarisées, elles expriment davantage de Pgp, qui est en fait un mécanisme de protection protégeant l'absorption de substances toxiques, d'un côté que de l'autre.^{65,66} Le côté en contact avec la solution du puits donneur est nommé « apical » et celui en contact avec la plaque acceptrice est désigné par l'adjectif « basolatéral ». Comme il s'agit d'une membrane biologique, la relation structure-perméabilité est beaucoup plus difficile à prédire, vu la présence du transport actif et du métabolisme intracellulaire (les cellules Caco-2 contiennent elles aussi des cytochromes P450 qui participent au métabolisme présystémique).^{65,67}

Une autre particularité de l'essai Caco-2 est que l'on fait l'expérience deux fois : d'abord comme pour PAMPA, en mettant le composé dans le puits supérieur (A), puis une deuxième fois en mettant le composé dans la plaque du côté basolatéral (B) et la solution tampon du côté apical.⁵⁰ Si le composé est un substrat pour un transporteur d'efflux et qu'on le place du côté basolatéral, la perméabilité observée sera plus grande de B vers A.⁶⁶ Le ratio des perméabilités observées en Basolatéral → Apical et en Apical → Basolatéral (communément appelé le rapport BA/AB) est utilisé pour déterminer l'efflux.⁵⁰ Contrairement à l'essai PAMPA, la membrane doit être bien caractérisée et il doit s'agir d'une monocouche. Afin de s'assurer de son intégrité, des mesures de résistance électrique transépithéliale (TEER) sont prises avant et après le test de perméabilité.⁵⁰ Tout comme les essais PAMPA, des composés de référence sont utilisés. Les valeurs de perméabilité obtenues en Caco-2 corréleront généralement avec celles obtenues en PAMPA, avec quelques exceptions notamment dans les cas impliquant des transporteurs (Tableau 4).

Tableau 4

Substance	F% ^{‡68}	Solubilité H ₂ O (mg/L) ^{69,70}	logD pH=7.4 ⁽⁶⁸⁾	PAMPA pH=7.4 (10 ⁶ cm/s) ⁶⁸	Caco-2 (10 ⁶ cm/s) ⁶⁸	Ratio d'efflux (BA/AB) ⁶²
Propranolol	93	61.7	1.26	23.5	41.9	5.56
Aténolol	52	13 300	-1.29	0.0	0.2	NA
Érythromycin	35	2 000	1.26	0.1	3.73	NA
Zidovudine	98	20 100	-0.58	4.9	6.93	NA
Cyclosporine	35	27.7 ⁽⁷¹⁾	2.31	0.3	0.9	NA
Furosémide	60	73.1	-0.69	0.6	0.12	2.27
Vérapamil	98	4.47	2.66	7.4	2.4 ⁽⁶²⁾	4.35
Antipyrine	100	51 900	0.34	13.2	28.2	0.29

[‡] F% : Biodisponibilité orale

D'autres lignées cellulaires peuvent être utilisées pour déterminer la perméabilité, notamment les cellules MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) et leurs dérivées LE-MDCK (*Low efflux Madin-Darby canine kidney*) exprimant peu de Pgp.⁷² L'avantage de ce type de cellule est qu'entre trois et cinq jours de culture sont nécessaires alors que les cellules Caco-2 ont besoin d'environ trois semaines.^{50,72,73} Par contre, la Pgp humaine et la Pgp canine sont différentes et certains médicaments peuvent être substrats de l'un et non de l'autre.^{72,74–76}

I.3 L'intérêt des macrocycles

On désigne généralement par le terme « macrocycle » un cycle comprenant 12 atomes et plus. Ce genre de structure suscite un intérêt grandissant en chimie médicinale (Figure 6). Plusieurs composés macrocycliques sont approuvés par la FDA – environ 70 en 2013 – et de nombreux en développement clinique.⁷⁷ La majorité de ces composés a été obtenue par isolation de source naturelle ou par dérivation d'un composé naturel.⁷⁸ Dans la sous-catégorie des peptides cycliques, comme le Linacotide, les cyclisations par un pont disulfure sont fréquentes.⁷⁹

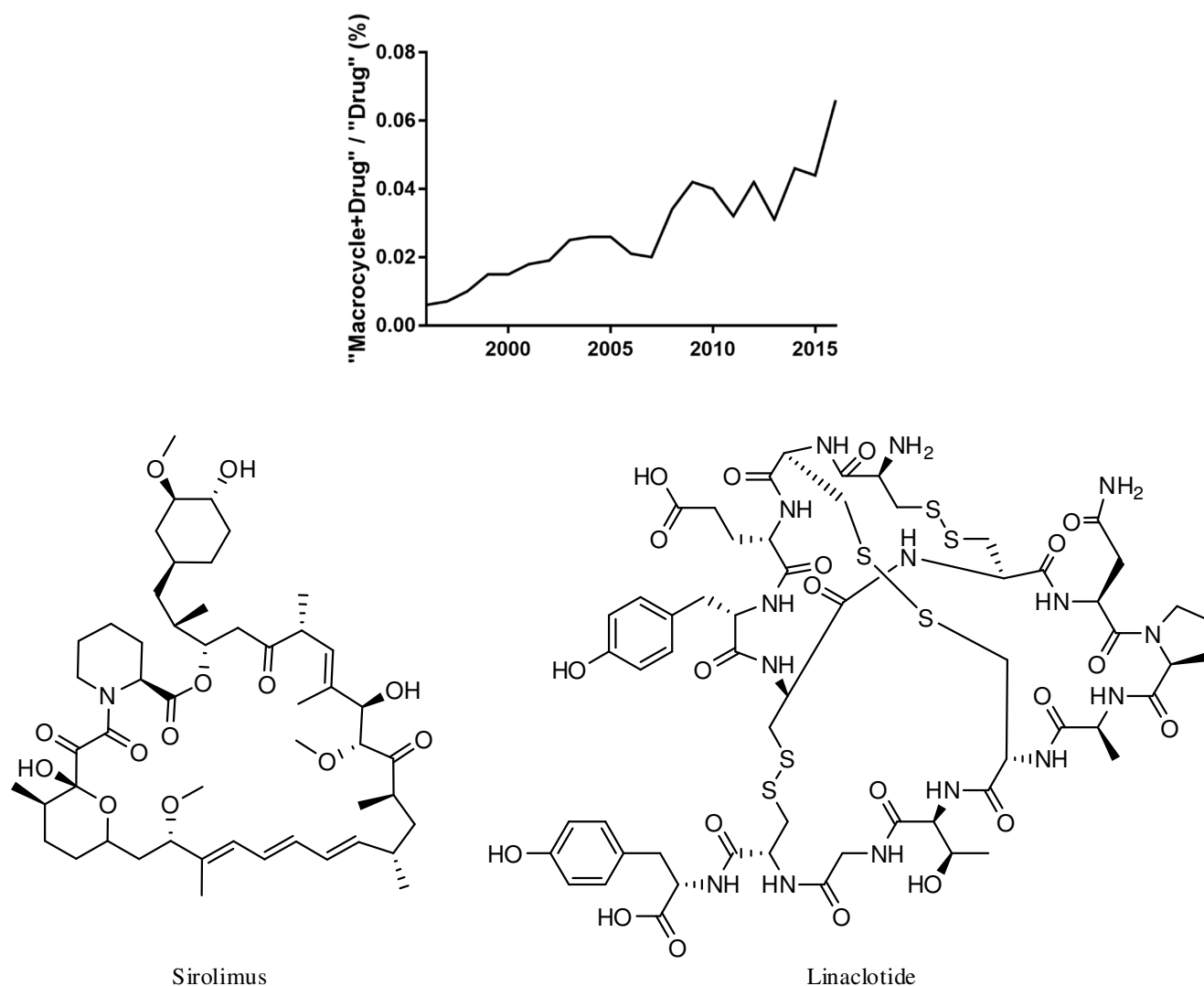


Figure 6 : **(haut)** Intérêt croissant des macrocycles, basé sur une recherche des termes « *macrocycle + drug* » et « *drug* » sur SciFinder. **(bas)** Deux exemples de composés macrocycliques approuvés par la FDA.

La macrocyclisation présente des avantages tant au plan pharmacodynamique que pharmacocinétique par rapport à des analogues linéaires. Dans les sections qui suivent, ces avantages seront discutés en portant une attention particulière aux macrocycles de nature peptidique.

I.3.1. Les peptides comme agents thérapeutiques

Les peptides occupent un espace peu occupé en terme de masse moléculaire : ils sont situés entre les « petites molécules » (MW < 500) et les « biopharmaceutiques » (MW > 5000) et sont fréquemment

utilisés pour la validation de cible.⁸⁰ L'avènement de la synthèse sur phase solide, développée initialement par Bruce Merrifield⁸¹, puis son automatisation, ont rendu la chimie peptidique très accessible, ce qui a permis de générer facilement beaucoup de composés. De plus, la grande diversité des résidus (acides, basiques, polaires non ioniques, hydrophobes et aromatiques) permet d'atteindre des affinités élevées avec différentes cibles et donne au chimiste médicinal de bons outils pour établir une relation structure-activité. À la vingtaine d'acides aminés naturels s'ajoutent de nombreux acides aminés synthétiques accessibles commercialement. Une recherche d'acides α -aminés non protégés, commercialement accessibles, excluant les sels et les isotopes relève plus de 120 000 composés sur SciFinder. Tout ceci est particulièrement avantageux dans ce domaine où le cycle conception-synthèse-essai-analyse est typiquement long.⁸² Il y a donc un grand intérêt à pouvoir étendre le champ d'application des peptides jusqu'à des principes actifs, tout en conservant l'aspect de simplicité dans la fabrication.^{80,83-85}

Le principal défi se situe au niveau pharmacocinétique : les peptides sont la cible de protéases, présentes dans l'ensemble de l'organisme⁸⁶ et jouant un rôle particulièrement important dans la digestion.^{83,87} De plus, leur grande surface polaire les rend peu aptes à traverser les membranes. Ainsi, malgré une grande demande pour des médicaments peptidiques disponibles oralement et malgré les solutions proposées dans ce but, seules la cyclosporine et le linacotide sont accessibles en formulation orale – sachant que le linacotide est peu absorbé et agit au niveau du tractus gastro-intestinal même.⁸⁸⁻⁹⁴ Les peptides constituent cependant de bons médicaments si une administration parentérale (i.v., s.c. ou i.p.) est désirée. Par exemple, l'insuline – l'une des plus grandes avancées pharmaceutiques canadiennes –, est un peptide de 51 résidus généralement administré par injection sous-cutanée.^{3,95}

Différents bioisostères du lien amide (Figure 7) ont été utilisés pour contrer à la fois le problème de surface polaire élevée et celui de la protéolyse.^{93,96} On retrouve par exemple des hétérocycles⁹⁷, esters⁹⁸⁻¹⁰⁰, alcènes^{101,102}, fluoroalcènes^{102,103}, thioamides¹⁰⁴, etc.^{93,105,106} Les molécules basées sur les peptides, mais comprenant des fragments non peptidiques sont désignées par le terme « semi-peptidique ».

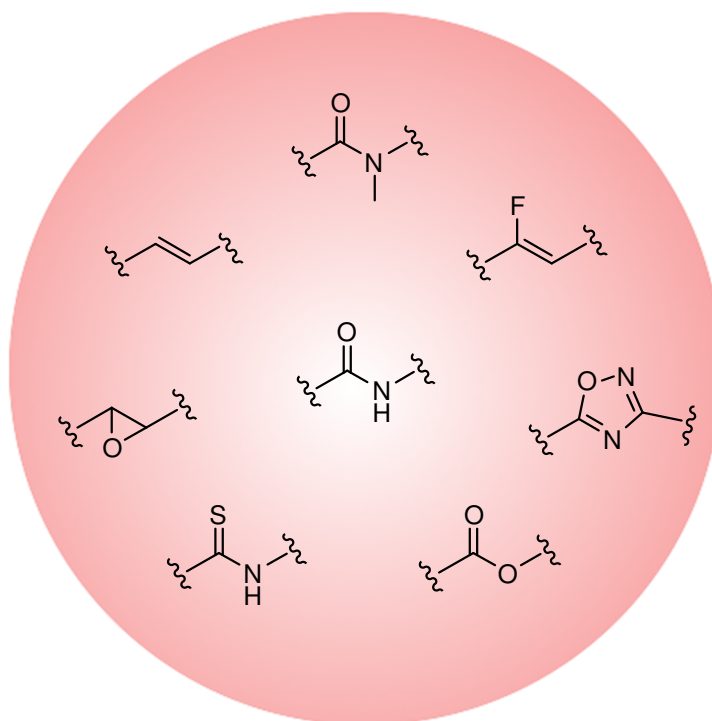


Figure 7 : Bioisostères d'amide

L'alkylation de l'azote du lien amide – le plus souvent par une N-méthylation – est une modification connue pour aider la stabilité protéolytique et la perméabilité.^{107–111} On enlève ainsi un donneur de pont H, ce qui a pour effet de diminuer la surface polaire et qui corrèle généralement avec une meilleure perméabilité. Une stratégie analogue à la N-méthylation d'acides aminés est leur remplacement par des N-alkylglycines (peptoïdes), où la chaîne latérale, normalement sur le carbone α , se trouve sur l'azote (Figure 8).

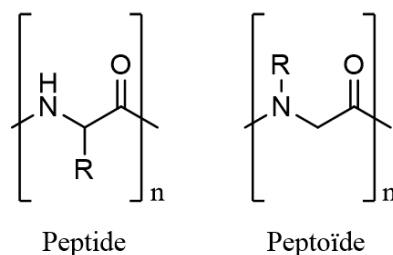


Figure 8 : Comparaison entre peptide et peptoïde

Les résidus de type peptoïde, contrairement aux résidus peptidiques, possèdent un azote tertiaire incapable d'être donneur de pont hydrogène, et sont achiraux. Il s'agit d'une différence importante au point de vue conformationnel : les ponts hydrogènes sont à la base des structures secondaires retrouvées dans les protéines. Néanmoins, les peptoïdes ont tout de même été utilisés pour induire certaines structures secondaires, par un effet similaire à la proline (Figure 9).^{112,113} Le lien peptidique des acides

aminés naturels est en effet très majoritairement *trans* (environ 1000:1, $\sim 54\text{-}58\text{ kJ mol}^{-1}$) dû à la répulsion stérique entre les hydrogènes en C_α et ceux de la chaîne latérale, mais ce rapport passe à environ 3:1 dans le cas de la proline ou des peptoides.^{114,115} Cette différence s'explique par la plus faible différence d'encombrement entre les deux rotamères, qui se traduit par une barrière de rotation plus basse.¹¹⁵

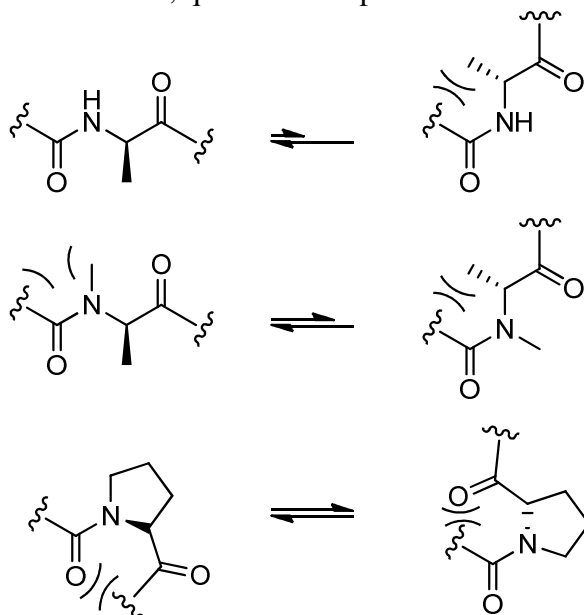


Figure 9 : Équilibre *cis-trans*

I.3.2. La restriction conformationnelle

Une observation qui a souvent été faite en conception de médicament est l'effet du « méthyle magique ». L'addition d'un méthyle au bon endroit peut parfois avoir un effet drastique sur les propriétés pharmacodynamiques ou pharmacocinétiques.¹¹⁶ Pourtant, il n'exerce qu'un faible effet sur les propriétés électrostatiques et hydrophobes globales. Sa contribution est généralement attribuée à un effet stérique, soit en relation à la cible, soit en exerçant une influence sur la conformation de la molécule. Dans ce dernier cas, on note par exemple que la substitution d'un hydrogène par un méthyle augmente la barrière rotationnelle autour des liens voisins.^{106,117} Un exemple simple de ce phénomène est observé avec le méthylcyclohexane (Figure 10), où la conformation possédant le méthyle en position équatoriale est environ 20x plus peuplée que celle possédant le méthyle en position axiale à 25° C ($\Delta E = 7.5\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$).¹¹⁸

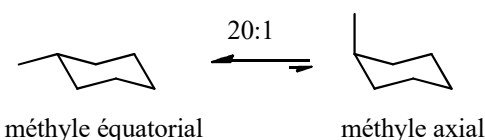


Figure 10 : Équilibre conformationnel du méthylcyclohexane

La restriction conformationnelle est donc un outil d'intérêt pour le chimiste médicinal. Comme discuté précédemment pour les macrocycles, ces restrictions amènent un changement du paysage conformationnel menant à des propriétés différentes malgré des structures 2D similaires. Ceci va dans le même sens que les observations de Veber, c'est-à-dire vers l'importance des propriétés de la structure tridimensionnelle et la diminution du nombre de liens libres. Cette stratégie de rigidification est particulièrement utilisée lors de l'optimisation d'une tête de série (*lead*) et peut amener une meilleure affinité¹¹⁹⁻¹²¹, une meilleure sélectivité^{122,123} et de meilleures propriétés pharmacocinétiques^{124,125}. Ce qui est particulièrement intéressant dans cette approche, c'est que pas ou peu de poids moléculaire est ajouté pour biaiser substantiellement la conformation de la molécule. Un exemple particulièrement illustratif est celui des agonistes de GPR119 développés par le groupe de Schofield (Tableau 5) où l'ajout d'un pont éthylène au bon endroit vient changer l'orientation du carbamate et permet d'augmenter l'affinité d'un facteur >100.¹²⁴

Tableau 5

Noyau	IC ₅₀ humain (μM)	EC ₅₀ humain (μM)
	0.351	0.065
	0.017	0.019
	0.092	0.079
	0.003	0.011

I.3.3. Avantages pharmacodynamiques des macrocycles

La macrocyclisation a pour effet de rigidifier la structure et cette augmentation de la rigidité peut être contrôlée afin de sélectionner une conformation ayant une bonne affinité envers une cible thérapeutique.^{126,127} Le concept d'affinité se retrouve dans toutes les interactions cible-ligand; cette

dernière est généralement quantifiée par la constante de dissociation (K_d) du ligand.³ Elle représente le rapport entre les concentrations de ligand libre (L) et de cible libre (C) sur la concentration de complexe cible-ligand (LC) :

Équation 2
$$K_d = \frac{[L][C]}{[LC]}$$

Comme il s'agit d'une constante d'équilibre, on y associe une énergie libre (ΔG_d) par :

Équation 3
$$\Delta G_d = -RT \ln(K_d)$$

L'énergie libre de dissociation est la différence de l'enthalpie de dissociation (ΔH_d) et l'entropie de dissociation (ΔS_d) :

Équation 4
$$\Delta G_d = \Delta H_d - T \Delta S_d$$

On peut séparer ces deux termes et analyser l'importance de chacun par rapport à l'affinité.

L'enthalpie traduit les interactions moléculaires entre la cible et le médicament. Ces interactions sont de plusieurs types, incluant les interactions ioniques, dipôle-dipôle, hydrophobes, pont hydrogène, et aromatiques.¹²⁸ La conception d'un ligand pouvant adopter une conformation qui maximise ces interactions est rationnelle quand la structure de la cible est connue. Cependant, même quand c'est le cas, l'entropie doit également être considérée. Différentes études se sont penchées sur ce sujet et suggèrent que dans la conception de médicaments, une première étape d'optimisation enthalpique soit suivie par une optimisation entropique.^{129–131} Faire cette deuxième optimisation peut, en effet, amener des variations importantes au point de vue affinité et sélectivité.

On distingue deux contributions entropiques. Compte tenu du fait que l'eau doit s'organiser pour solubiliser les molécules, une première contribution – favorable – est qu'après l'association du ligand à la cible, les surfaces qui interagissent ne sont plus exposées à l'eau.^{132,133} Ce faisant, le facteur entropique de l'eau diminue, puisque moins de molécules sont impliquées dans la solvation. En effet, lorsque les molécules d'eau solvatent une cible, qui possède une topologie ordonnée, ces molécules d'eau sont dans un état d'ordre plus élevé que si elles sont impliquées dans des liens avec d'autres molécules d'eau. La deuxième contribution – défavorable – est liée à la rigidification. En effet, pour s'associer à la cible, le ligand doit passer d'une structure flexible à une conformation hautement organisée, ce qui correspond à

un terme entropique élevé amenant une diminution de l'affinité (K_d élevée).^{134,135} Dans ce contexte, l'intérêt des structures macrocycliques est qu'elles possèdent moins de degrés de liberté que leurs analogues linéaires.¹³⁶ Cette rigidité intrinsèque diminue le coût entropique associé au changement de conformation pendant la liaison. Bien sûr, pour que ceci soit vrai, la macrocyclisation doit se faire de telle sorte que la conformation liante soit facilement accessible. De plus, cet avantage thermodynamique est obtenu en « payant » le prix entropique durant la synthèse lors de l'étape de macrocyclisation : ces réactions se font typiquement à très basses concentrations (<0.05 mmol/L).^{126,127} Si l'on considère ceci sous l'angle des paramètres de Veber, le nombre de liens libres est plus petit dans une molécule cyclique que dans une molécule linéaire, bien que dans le cas de macrocycles il reste un certain degré de liberté dans les liens endocycliques, toutefois inférieur à celui que l'on retrouve dans une molécule linéaire.

Un autre avantage de cette augmentation de la rigidité dans les macrocycles est la possibilité de mimer des structures secondaires de protéines^{127,137,138} tel un feuillet β ^{139,140}, un tournant β ¹⁴¹ ou une hélice¹⁴² (Figure 11). C'est ce contrôle de la structure tridimensionnelle qui permet de cibler des interactions protéine-protéine (IPP) avec des macrocycles^{78,138}.

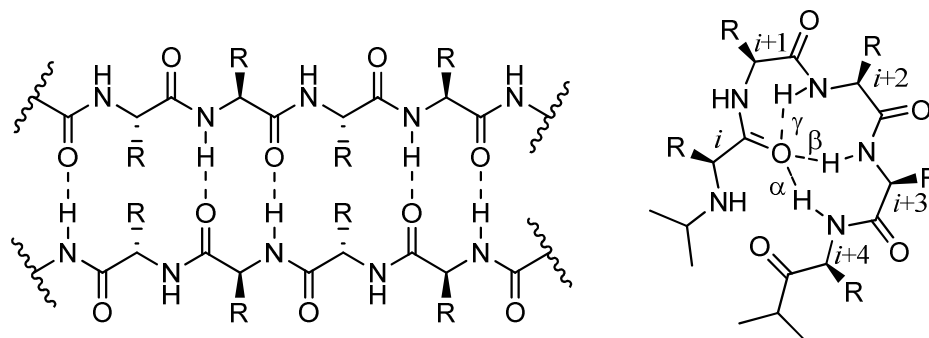


Figure 11 : Arrangement d'un peptide en (**gauche**) feuillet β et en (**droite**) tournants α , β et γ ¹³⁷

Un exemple de mimétisme de structures secondaires est celui de l'inhibiteur de la protéase HIV-1 synthétisé par le groupe de David P. Fairlie (Figure 12).¹⁴³ La macrocyclisation a pour effet de restreindre le cycle dans une conformation se rapprochant de celle formée par un feuillet β , forme qui est observée comme étant la conformation active des inhibiteurs linéaires de cette protéase.

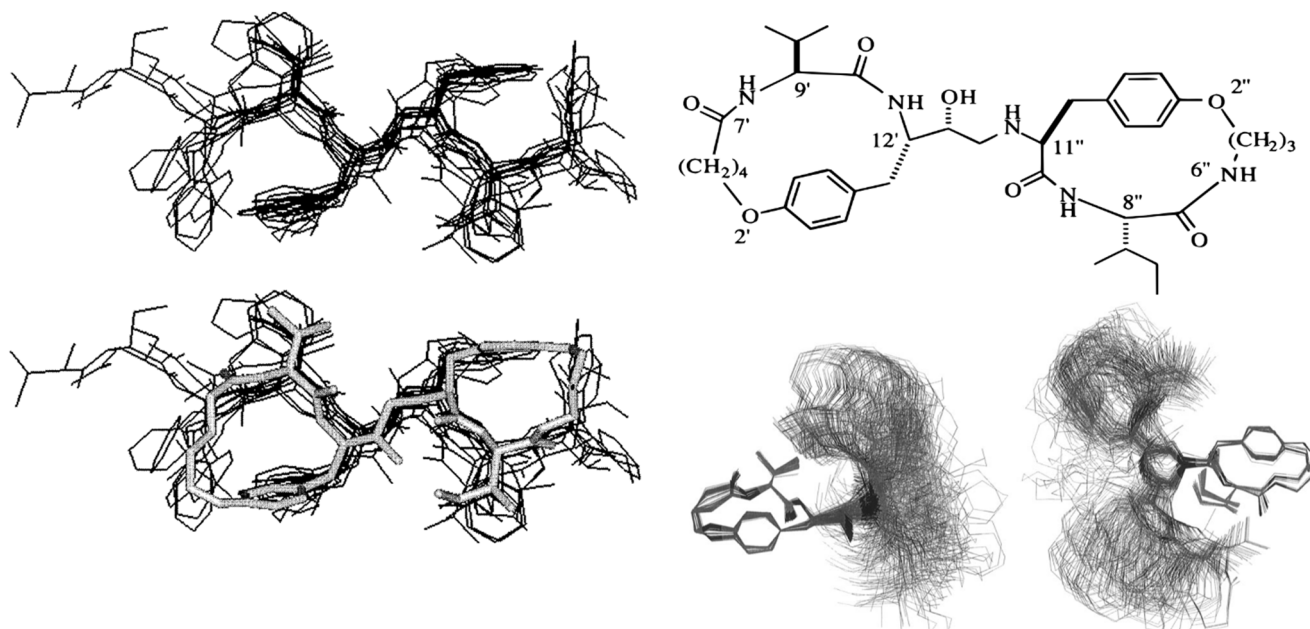


Figure 12 : **(gauche)** Superposition d'un bicyclic mimant un feuillet β sur les conformations liantes de 12 inhibiteurs de HIV-1 connus. **(droite)** La trajectoire de dynamique moléculaire montre que les liens reliant les deux cycles sont très flexibles, mais que les cycles demeurent relativement rigides.¹⁴³

Reproduit avec la permission de American Chemical Society, copyright 1996.

Les IPP sont une classe de cibles jusqu'à présent difficiles à exploiter, mais possédant un énorme intérêt pharmacologique.¹⁴⁴ Pour cause, on en retrouve dans la majorité des processus biologiques, mais elles sont considérées comme difficiles à cibler : contrairement à la majorité des autres classes de cibles (*e.g.* enzymes, GPCRs) qui présentent des pochettes dans lesquelles peuvent venir s'insérer de petites molécules, les surfaces d'interaction entre deux protéines sont typiquement grandes et souvent planaires.^{145–147} L'espace chimique des IPP représente plusieurs centaines de milliers de membres; c'est donc un nouvel espace chimique qui vaut la peine que l'on développe des molécules performantes.^{148–150} Jusqu'à maintenant, les petites molécules traditionnelles, qui ont été optimisées pour des cibles possédant des poches de liaison plus petites et mieux définies que les IPP, ont donné des résultats assez médiocres contre les IPP.¹⁵¹ Par exemple, lors de la recherche d'un inhibiteur de la protéase NS3 du virus de l'hépatite C (Figure 13), le groupe de recherche de Boehringer Ingelheim a comparé les concentrations inhibitrices médianes (IC_{50}) d'un composé linéaire et d'un analogue macrocyclique et a observé une efficacité plus élevée pour le macrocycle.

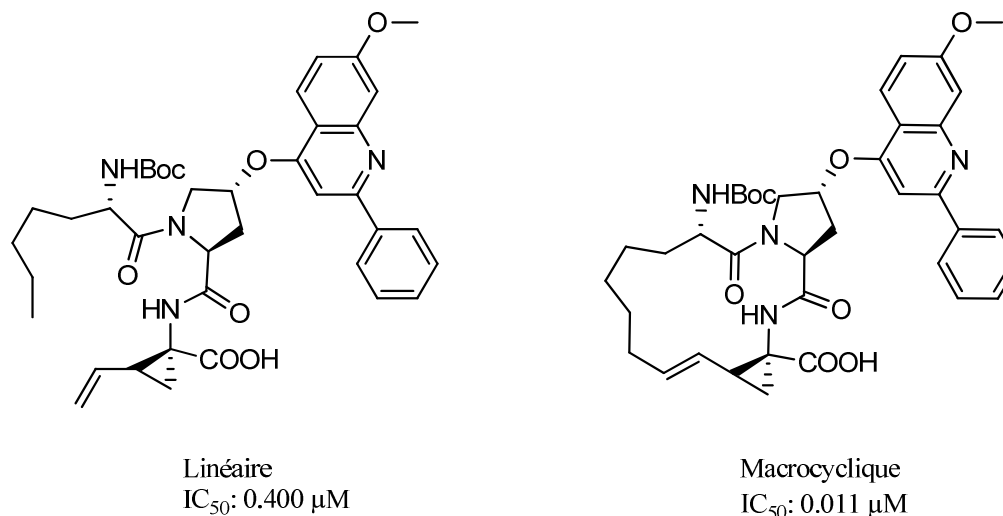


Figure 13 : Comparaison d'efficacité entre deux composés inhibant la protéase NS3 du virus de l'hépatite C.¹⁵²

Un autre exemple est celui des inhibiteurs de métalloprotéinases développés par Merck (Tableau 6).¹⁵³ Dans ce cas, une haute sélectivité pour MMP-8 a pu être obtenue avec un composé macrocyclique. Cet exemple montre un autre avantage des molécules rigides : un paysage conformationnel restreint signifie moins d'interactions possibles sur d'autres cibles que celle pour laquelle la molécule a été conçue.

Tableau 6

Linéaire

Cyclique

Composé	K_i (nM) ¹⁵³				
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-8	MMP-9
Linéaire	2860	1533	14088	293	404
Cyclique	2500	8100	13500	17	6600

Le contrôle de la structure secondaire prend donc toute son importance si on veut interagir de façon sélective avec des surfaces étendues et structurées. Les macrocycles, en possédant un poids moléculaire

supérieur aux petites molécules classiques et en exposant des pharmacophores parfois distants, mais dans une topologie bien définie, ont ainsi le potentiel d'accéder à ces cibles sans pour autant avoir un poids moléculaire trop élevé. Le succès récent de peptides agrafés (*stapled peptides*) en hélices α par des chaînons non peptidiques illustre bien ce cas.^{154–156} Par exemple, le groupe de Verdine a développé des peptides agrafés en hélices α (Figure 14) qui sont capables d'interférer avec le complexe β -catéine/TCF4 (T Cell Factor 4).¹⁵⁵ Ces peptides ont été conçus à partir d'un fragment de l'Axin-1 (« fAxWT »), connu pour se lier à la β -catéine par son motif d'hélice α . On remarque que la position de l'agrafe sur le peptide amène de grandes variations en affinité.

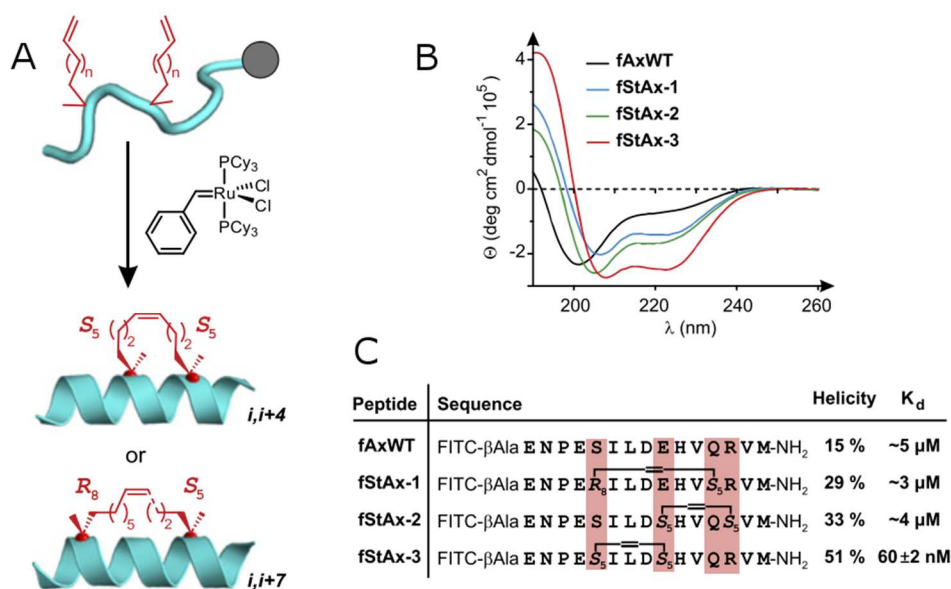


Figure 14 : Résultats du groupe de Verdine sur l'inhibition du complexe β -catéine/TCF4 à l'aide de peptides agrafés en hélices α .¹⁵⁵ (A) Procédé de macrocyclisation par métathèse croisée. (B) Courbes de dichroïsme circulaire utilisées pour caractériser la structure secondaire. (C) Séquence des composés, niveau d'hélicité et constantes d'affinité. Reproduit et adapté avec la permission de National Academy of Sciences, copyright 2012.

On retrouve des exemples de macrocycles isolés de source naturelle qui ciblent des interactions protéine-protéine.^{78,144} La cyclosporine (Figure 15), isolée du champignon *Tolypocladium inflatum* et utilisée comme immunosuppresseur pour la transplantation d'organes, est à cet égard probablement l'exemple le plus connu.¹⁵⁷

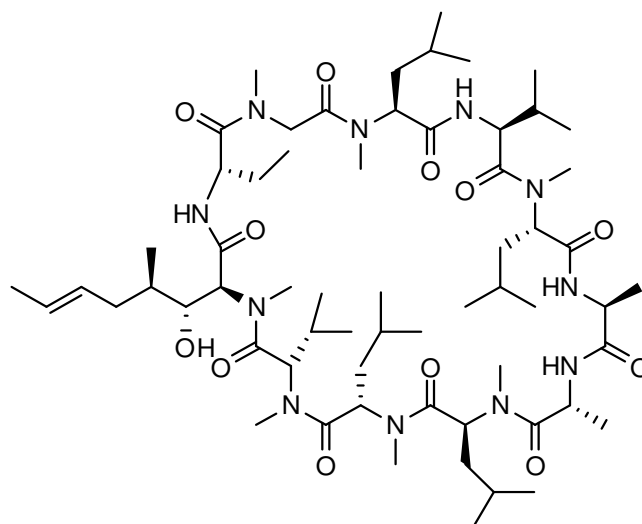


Figure 15 : Cyclosporine

Son mécanisme d'action canonique (Figure 16) consiste à réduire l'activité des lymphocytes T, en empêchant la formation du complexe entre la calcineurine et la cyclophiline en venant se lier elle-même à la cyclophiline. Ceci mène ultimement à une diminution de la production d'interleukine 2 (IL-2), qui est directement reliée à la réponse immunitaire.¹⁵⁸ La cyclosporine a également un effet sur les kinases JNK et p38, qui mène également à une diminution d'IL-2.^{159,160} Ceci suggère que la cyclosporine est capable d'adopter différentes conformations lui permettant d'interagir avec de multiples cibles. De plus, sa haute perméabilité s'explique par sa capacité à former des ponts H intramoléculaires (voir section suivante), ce qui fait de la cyclosporine une molécule hautement « caméléonique ».^{161,162}

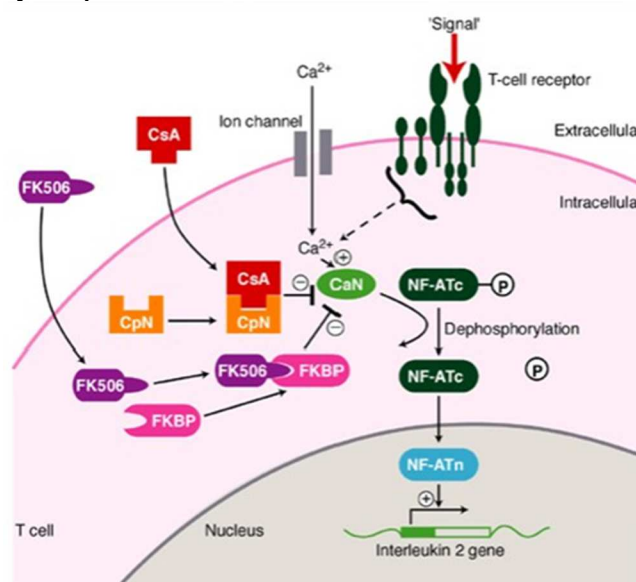


Figure 16 : Mécanisme d'action de la cyclosporine (CsA) et du tacrolimus (FK506)¹⁶³ Reproduit avec la permission de Cambridge University Press, copyright 2000.

I.3.4. Avantages pharmacocinétiques potentiels des macrocycles

Les macrocycles peptidiques peuvent être obtenus par cyclisation entre deux résidus ou en impliquant un ou deux termini (Figure 17). La cyclisation impliquant l'acide et/ou l'amine terminal en particulier est alors intéressante au niveau de la stabilité protéolytique, car certaines classes de protéases reconnaissent et clivent les fonctions terminales (exopeptidases).^{93,105,164} De plus, la structure plus rigide d'un composé macrocyclique peut être modulée pour en faire un moins bon substrat de ces enzymes, qui reconnaissent généralement une conformation de brin β , ou au contraire pour forcer une conformation en brin β si on veut en faire des inhibiteurs à protéases.^{165–167}

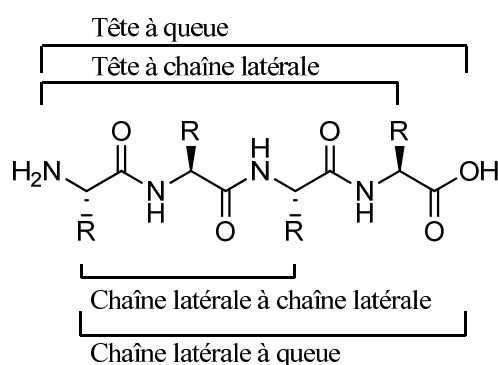


Figure 17 : Différents modes de macrocyclisation d'un peptide.

Du point de vue de la perméabilité, les peptides cyclisés tête-à-queue sont donc généralement meilleurs, puisqu'ils perdent du fait même deux groupements ionisés aux pH physiologiques.⁴³ Un autre facteur est la réduction de la liberté de rotation des liens endocycliques. En effet, selon les règles de Veber, le nombre de liens libres est un facteur majeur défavorable pour la biodisponibilité orale.⁴⁰ Comme vu précédemment, les liens amides dont sont composés les peptides ont l'avantage d'être rigides, avec une conversion *cis-trans* lente. Du fait de la structure cyclique, les autres liens composant le macrocycle sont donc également plus contraints (la Figure 12 l'illustre bien).¹⁴³ Malgré ces avantages, les multiples liens peptidiques sont source d'une surface polaire élevée limitant la perméabilité. Une première approche proposée pour contrer cet effet s'inspire de la cyclosporine, qui compte sept résidus N-méthylés et un résidu de stéréochimie D. Les groupes de Kessler et de Hoffman ont étudié l'effet de ces deux modifications sur différents macrocycles et n'ont rapporté aucune corrélation entre la perméabilité passive et le nombre de N-méthylations, mais ont noté les grandes variations observées en fonction de leur position au sein du macrocycle.^{161,168} Le groupe de Lokey a développé une méthode computationnelle prédictive, permettant dans une certaine mesure de faire ressortir des corrélations entre structure et

perméabilité.^{169,170} Le paramètre présentant la meilleure corrélation dans leur analyse, présenté ci-dessous (Figure 18), est l'énergie d'insertion ΔG_i :

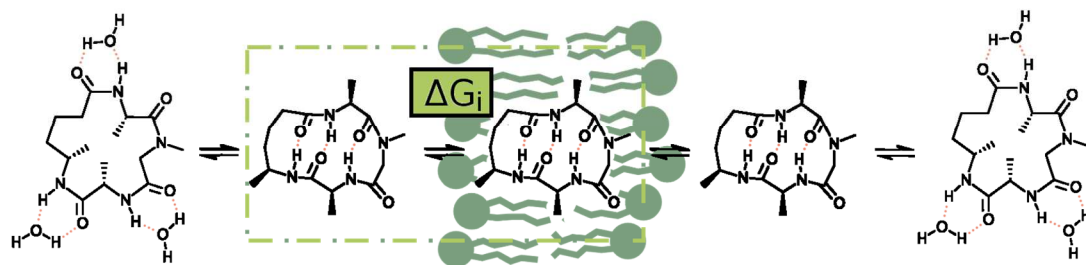


Figure 18 : Modèle proposé par Lokey *et al.*

ΔG_i correspond à la différence d'énergie entre la conformation la plus basse en énergie dans un milieu hydrophobe comparée à la même conformation en milieu hydrophile. La comparaison du ΔG_i simulé et de la perméabilité en essai PAMPA de 11 composés a donné un coefficient de corrélation R^2 de 0.96, ce qui semble valider ce paramètre comme un bon prédicteur de perméabilité. D'autres paramètres corrélaient moins bien, par exemple le nombre de ponts H intramoléculaires (bien qu'il s'agisse de nombres discrets) et la surface polaire totale.¹⁶⁹

L'aptitude d'une molécule à changer de conformation – une présentant une surface polaire élevée, pour être soluble en milieu aqueux, et l'autre la masquant, pour être soluble dans les membranes lipophiles – a été proposée comme la clé de l'utilité pharmacologique des macrocycles.¹⁶² Le groupe de Kihlberg a également essayé de trouver une corrélation entre la perméabilité de différents types de macrocycles et certaines propriétés physico-chimiques.¹⁷¹ Cependant, la corrélation obtenue correspond à un ensemble de solutions comprenant plusieurs coefficients (un total de 21 incluant logP, aromaticité, nombre de cycles, etc.) pour relativement peu de composés (214 macrocycles).

Bien que la corrélation entre surface polaire et perméabilité soit généralement forte, de récentes études sur des peptides cycliques démontrent qu'une alkylation complète des amides mène à une perte de perméabilité (Figure 19).^{111,172} Les résultats de ces études ont mené à l'hypothèse selon laquelle il est préférable de conserver certains ponts H intramoléculaires stabilisants lors du passage en milieu lipophile (*i.e.* la double couche lipidique), ce qui est important pour ce qu'on pourrait appeler « caméléonisme » du composé, soit la capacité d'exposer ou de masquer différents groupements en fonction du milieu dans lequel il se trouve.¹⁶²

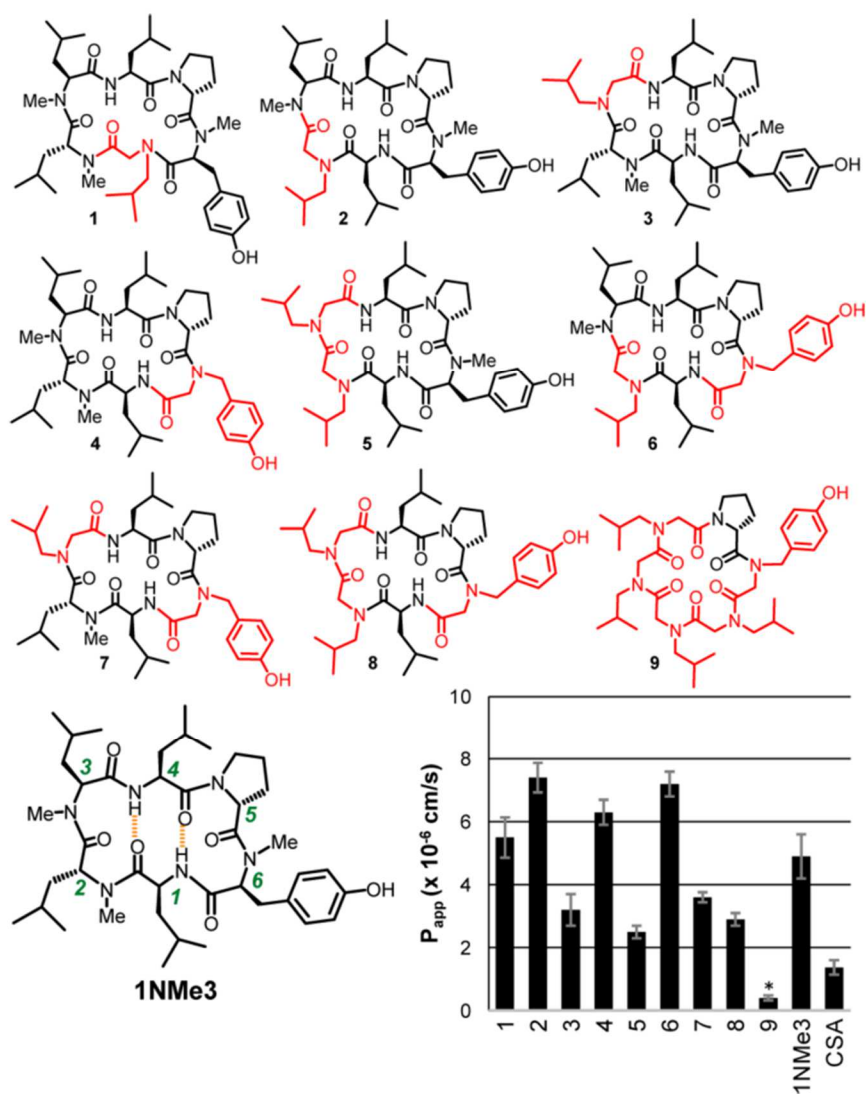


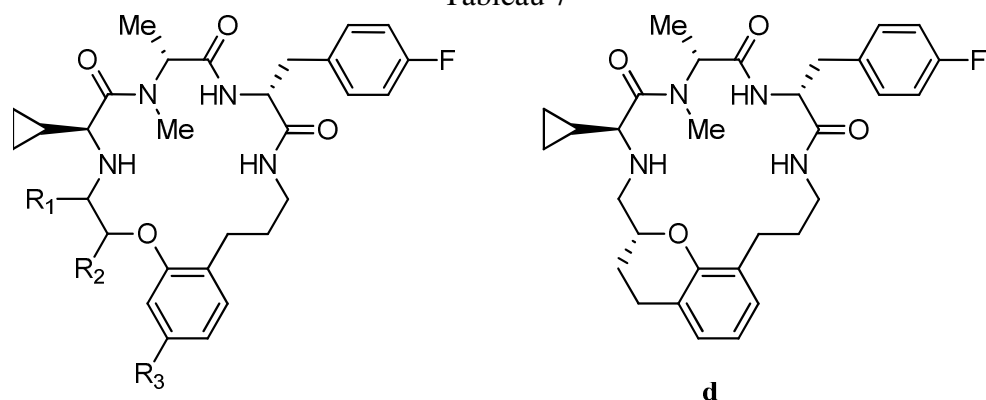
Figure 19 : Effet de différentes substitutions d'un acide aminé par un peptide sur la perméabilité apparente de cellules MDCK-LE.¹⁷² Reproduit et adapté avec la permission de American Chemical Society, 2015.

Même avec les avancées de la chimie computationnelle, il demeure difficile de décrire avec une bonne précision le paysage conformationnel des molécules macrocycliques. Les champs de force développés pour les protéines n'arrivent pas à prédire avec une bonne précision les conformations les plus stables des macrocycles peptidiques, bien que certains nouveaux champs de force soient en développement pour pallier à cette limitation.¹⁷³

I.3.5. Macrocycles semi-peptidiques

Afin de pouvoir exercer un plus grand contrôle à la fois sur la conformation des peptides cycliques et sur leurs propriétés pharmacocinétiques, l'incorporation d'une portion non peptidique a été envisagée par plusieurs groupes de recherche.^{127,174-176} Cette stratégie permet de tirer profit des hautes affinités et de la facilité de construction des peptides tout en conservant un levier synthétique pouvant influencer la conformation globale. De plus, l'assemblage de différents chaînons sur une même séquence d'acides aminés permet la production en parallèle de grandes bibliothèques de composés. Par exemple, le groupe de Tranzyme a incorporé différents chaînons non peptidiques dans leur design d'agonistes de la ghréline et ont synthétisé plus de 20 000 macrocycles.¹⁷⁵ Leurs résultats (Tableau 7) montrent clairement les effets possibles suite à l'optimisation du chaînon, tant en pharmacocinétique qu'en pharmacodynamique.

Tableau 7



Composé	Substitution	K_i (nM)	EC_{50} (nM)	CL ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$)	F%
a	$R_2 = (R)\text{-Me}$	16	29	ND	ND
b	aucune	7.3	ND	72	ND
c	$R_2 = (S)\text{-Me}$	9.0	760	64	ND
d	(voir dessin)	0.9	85	13	ND
e	$R_3 = \text{F}$	2.6	27	28	36
f	$R_2 = (R)\text{-Me}, R_3 = \text{F}$	61	ND	9	15

Figure 20 : Sélection de macrocycles semi-peptidiques agonistes de la ghréline.¹⁷⁵

On remarque notamment les grandes différences d'activité entre les composés **a** et **c**, qui ne diffèrent que par la stéréochimie d'un méthyle du chaînon.

I.4 Description du projet

I.4.1. But et hypothèses

Ce projet de maîtrise a pour hypothèse que l'insertion d'un biais conformationnel au sein d'un macrocycle peut permettre de moduler la perméabilité. Afin de vérifier cette hypothèse, deux types de biais conformationnels ont été envisagés : sur le squelette peptidique et sur le chaînon. Les objectifs suivants ont été proposés : synthétiser une petite librairie de composés portant ces modifications et évaluer leur perméabilité par les essais PAMPA et Caco-2.

I.4.2. Design

La conception des macrocycles à synthétiser a été faite de façon à varier un seul paramètre à la fois. Afin d'imposer une contrainte conformationnelle sur le squelette, différentes modifications structurales étaient envisageables et plusieurs avaient déjà été étudiées, particulièrement la N-méthylation^{177,178} et l'utilisation d'acides aminés de stéréochimie non-naturelle^{170,177,179}. L'usage d'un peptoïde (Figure 21) est apparu judicieux : non seulement peu de recherche a déjà été faite sur l'incorporation de peptoïdes dans des macrocycles, mais il s'agit d'une modification n'entraînant aucune différence dans le poids moléculaire tout en ayant différents effets par rapport à l'amide : géométrie différente, flexibilité *cis-trans* accrue, perte du donneur de pont H, meilleur accepteur de pont H. Pour la contrainte conformationnelle imposée par le chaînon, l'incorporation d'un groupement méthyle à différents endroits et de différentes stéréochimies a été le choix retenu. Pour observer les plus grandes différences entre les composés, il est probable que l'usage d'un groupement plus encombré (*e.g. tert-butyle*) aurait été préférable, mais la comparaison avec les composés sans ce groupement aurait été difficile, car en plus d'imposer une grande contrainte conformationnelle, le *tert-butyle* vient également beaucoup changer la lipophilicité de la molécule. C'est pourquoi le méthyle nous est apparu comme un modulateur plus spécifique à la rigidité.

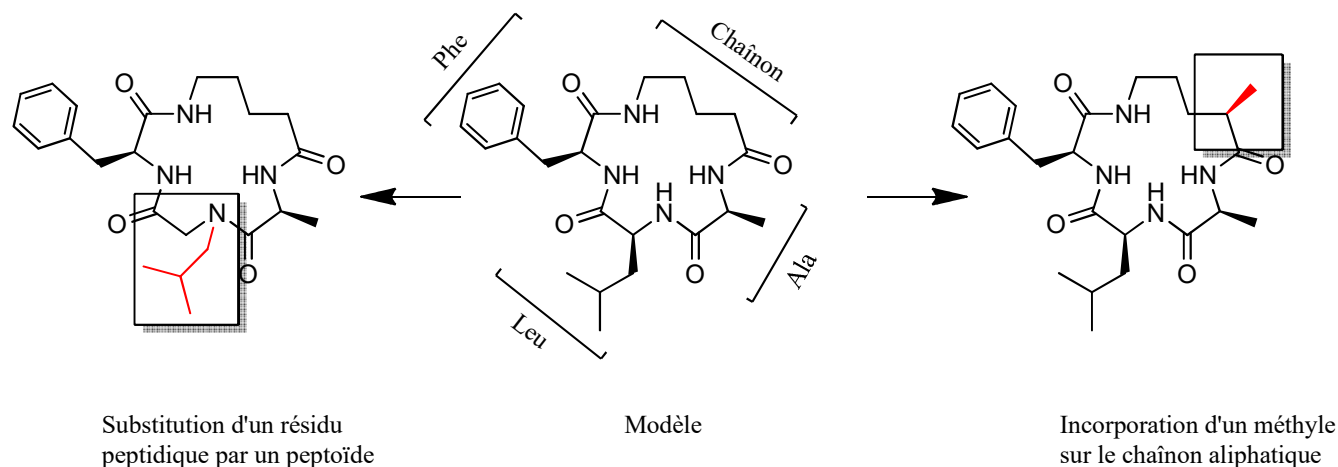


Figure 21 : Description graphique des modifications envisagées.

Toujours dans l'optique de faire varier un minimum de paramètres, certains choix ont été faits tôt dans la conception, incluant la taille du cycle – fixée à 15 atomes – et la séquence d'acides aminés. Les résidus Phe, Leu et Ala ont été choisis, car leurs chaînes latérales possèdent des signaux ^1H RMN facilement identifiables, ce qui facilite les caractérisations à l'issue de la synthèse et pour les études conformationnelles. Aussi, il s'agit de résidus lipophiles, donc permettant d'avoir une certaine perméabilité de base. Comme l'intérêt de l'étude était d'évaluer l'étendue des perméabilités générées, il était important d'obtenir la plus grande plage de détection possible. L'utilisation d'un groupement aromatique (*i.e.* le groupement phényle de la phénylalanine) a également assuré un suivi plus facile par spectroscopie UV. Le chaînon qui a été utilisé est un acide aminé de cinq carbones portant un groupement méthyle chiral en position 2, 3, 4 ou 5, ce qui donnait un total de neuf chaînons, incluant celui ne portant pas de groupement méthyle (Figure 22).

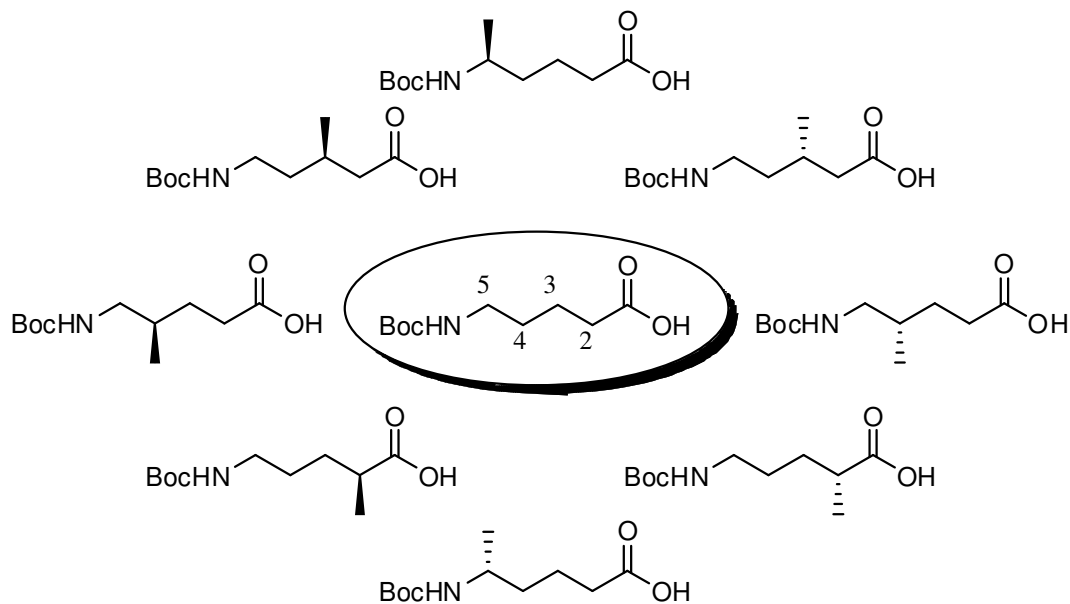


Figure 22 : Liste des neuf chaînons sélectionnés

La nature des macrocycles ainsi établie, on obtient une librairie (Figure 23) comprenant neuf isomères de position du méthyle (incluant son absence) et quatre motifs de substitutions peptidiques (incluant aucune) pour une somme de 36 composés. Suite aux résultats obtenus, deux macrocycles supplémentaires, décrits plus loin, ont été synthétisés pour un total de 38.

	Ø	2R	2S	3R	3S	4R	4S	5R	5S
Ø	Ø-Ø	Ø-2R	Ø-2S	Ø-3R	Ø-3S	Ø-4R	Ø-4S	Ø-5R	Ø-5S
Nala	Nala-Ø	Nala-2R	Nala-2S	Nala-3R	Nala-3S	Nala-4R	Nala-4S	Nala-5R	Nala-5S
Nleu	Nleu-Ø	Nleu-2R	Nleu-2S	Nleu-3R	Nleu-3S	Nleu-4R	Nleu-4S	Nleu-5R	Nleu-5S
Nphe	Nphe-Ø	Nphe-2R	Nphe-2S	Nphe-3R	Nphe-3S	Nphe-4R	Nphe-4S	Nphe-5R	Nphe-5S

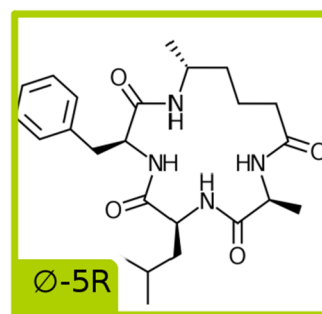
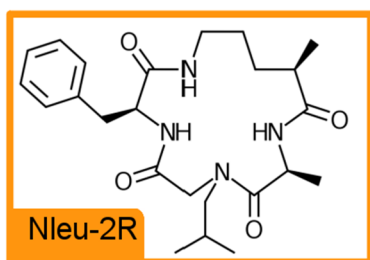


Figure 23 : Description de la librairie, incluant 2 exemples décrivant la nomenclature choisie

On a attribué à ces composés des noms correspondant aux deux variables qui les distinguent, présentées dans le tableau précédent. Le macrocycle ayant subi une substitution par un peptoïde sur le résidu leucine et comprenant un groupement méthyle en position 3 de stéréochimie R s'est vu attribuer le nom Nleu-3R. La nomenclature des peptoïdes diffère d'un groupe de recherche à l'autre, le style utilisé par Paul A. Bartlett a été utilisé où l'abréviation de l'acide aminé en trois lettres minuscules est précédée de « N ». ¹⁸⁰ Pour représenter les cas où il n'y a pas eu de substitution ou pour représenter l'absence de méthyle, le symbole d'ensemble vide (\emptyset) est utilisé.

I.5 Approche rétrosynthétique

La stratégie de synthèse a été conçue en trois étapes : (1) synthèse du chaînon, (2) synthèse sur support solide du peptide puis accrochage du chaînon et clivage de la résine, (3) macrocyclisation en solution. Les synthèses de composés chiraux peuvent poser des problèmes particuliers, soit au moment de l'installation du centre chiral, soit pour le caractériser, puis pour éviter la racémisation lors des étapes subséquentes. La première stratégie envisagée reposait sur l'hydrogénation asymétrique de Noyori, car ce type de transformation est prévalent pour l'introduction d'un centre chiral. ¹⁸¹

I.5.1 Hydrogénation asymétrique

Ce premier plan rétrosynthétique (Figure 24) a été conçu afin de synthétiser les chaînons 2-Me et 3-Me en s'inspirant d'une publication du groupe de Noyori, qui rapporte l'hydrogénation asymétrique de différents acides α,β -insaturés avec différents substituants. ¹⁸² L'avantage de cette voie de synthèse était qu'elle permettait de faire la synthèse jusqu'à l'alcène et à partir de cet intermédiaire avancé commun, produire les deux énantiomères séparément en changeant de catalyseur.

Comme certains problèmes ont été rencontrés avec cette voie de synthèse (voir Chapitre 1), des stratégies rétrosynthétiques différentes ont été choisies pour chacun des quatre chaînons et sont décrites ci-dessous. Dans tous les cas, les chaînons portent un groupement protecteur sur la fonction amine compatible avec la chimie sur support solide.

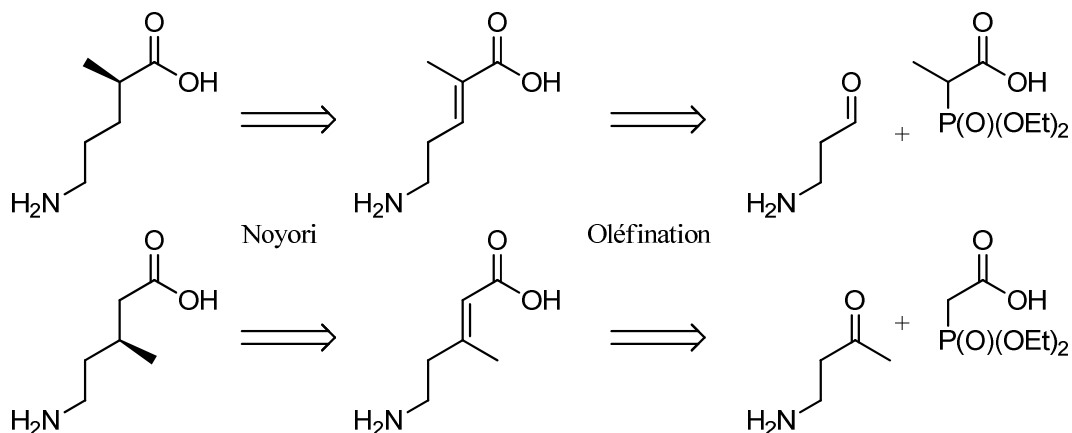


Figure 24 : Rétrosynthèse par hydrogénation asymétrique de Noyori

I.5.2. Méthyle en position 2

Comme il s'agit ici du carbone en alpha du carbonyle, l'utilisation d'un auxiliaire du type oxazolidinone chiral a semblé être un bon choix (Figure 25). La synthèse de l'acide aminé non-protégé avait déjà été réalisée par un autre groupe¹⁸³ qui utilise la fonction azoture comme précurseur relativement inerte de l'amine.

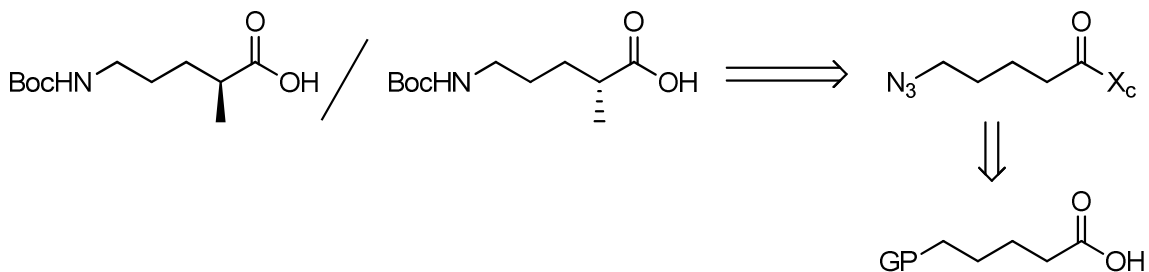


Figure 25 : Rétrosynthèse des chaînes 2-Me

I.5.3. Méthyle en positions 3 et 4

Plusieurs approches ont été imaginées pour ces deux composés. L'éloignement des centres chiraux par rapport aux groupements terminaux les rendait plus difficiles à faire dans un nombre d'étapes raisonnables. L'idée d'utiliser le citronnellol chiral comme produit de départ commun a permis de résoudre ce problème pour les deux composés (Figure 26).

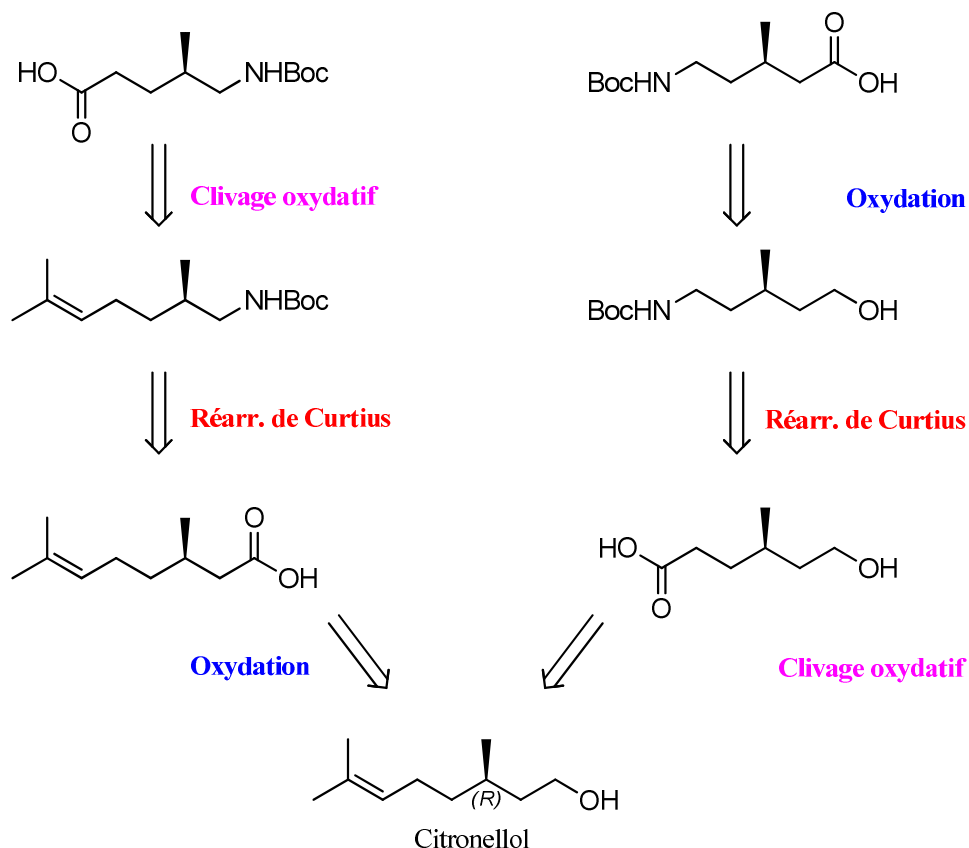


Figure 26 : Rétrosynthèse des chaînons 3-Me et 4-Me. Pour simplifier la figure, seule la rétrosynthèse d'une des deux paires d'énantiomères est montrée.

Le citronellol possède deux fonctions terminales distinctes de chaque côté du méthyle chiral. Il était donc envisageable de transformer sélectivement chaque extrémité jusqu'à obtenir les fonctionnalités désirées. De plus, il est accessible commercialement dans les deux stéréochimies. Deux transformations clés ont été envisagées, soit le clivage oxydatif de l'alcène pour obtenir un acide carboxylique, et le réarrangement de Curtius permettant de transformer un acide en un carbamate comportant un carbone de moins.

I.5.4. Méthyle en position 5

Comme le centre chiral est situé sur le carbone en alpha de l'amine, le plan rétrosynthétique de ce chaînon (Figure 27) a été envisagé à partir de l'acide aminé portant cette chaîne latérale : l'alanine. L'acide carboxylique peut être transformé en aldéhyde ou en groupement partant, puis être homologué par oléfination ou par alkylation. Un avantage de cette stratégie est la disponibilité des deux énantiomères et leur faible coût.

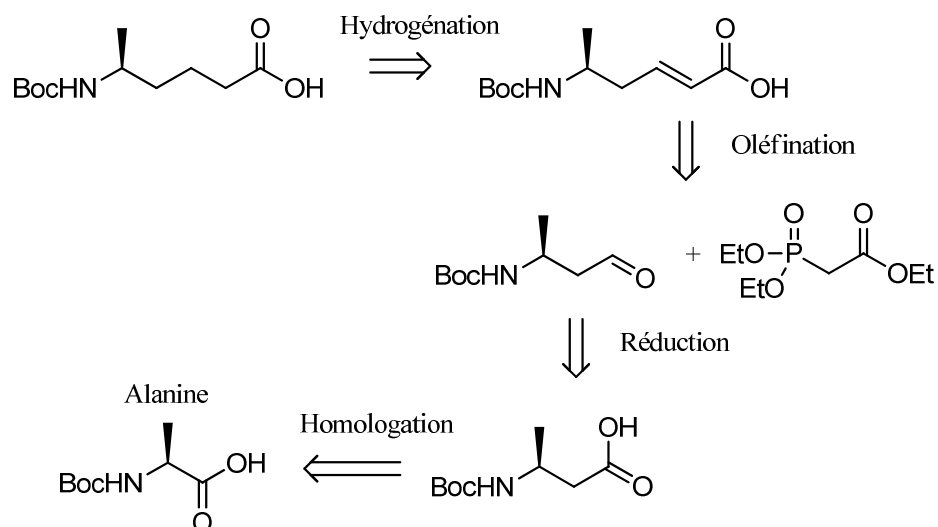


Figure 27 : Rétrosynthèse des chaînons 5-Me. Pour simplifier la figure, seule la rétrosynthèse d'une des deux paires d'énantiomères est montrée.

I.5.5. Phase solide

L'assemblage des peptides/peptoïdes et du chaînon a été planifié sur support solide, en partant de la résine de Wang (Figure 28), qui présente l'avantage d'être à la fois robuste et peu dispendieuse.

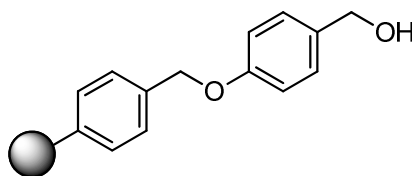


Figure 28 : Résine de Wang

La synthèse sur support solide se fait par un processus itératif (Figure 29), en utilisant la chimie Fmoc.^{81,184} Le principal avantage de ce type de chimie est que la purification s'en trouve simplifiée : une fois la réaction terminée, les réactifs et les sous-produits peuvent être filtrés alors que le composé d'intérêt reste attaché chimiquement à la résine. En alternant différents solvants, il est possible d'obtenir d'excellentes puretés et de hauts rendements à chaque étape. À la fin de la synthèse, le composé est clivé de la résine par une réaction qui varie en fonction de la nature de l'attachement du composé à la résine.

Dans le cas de la résine de Wang, les acides sont attachés par une réaction de Mitsunobu et il s'agit donc d'un lien ester.¹⁸⁵ Cet ester est clivé dans des conditions acides fortes, typiquement 50 % de TFA/DCM.

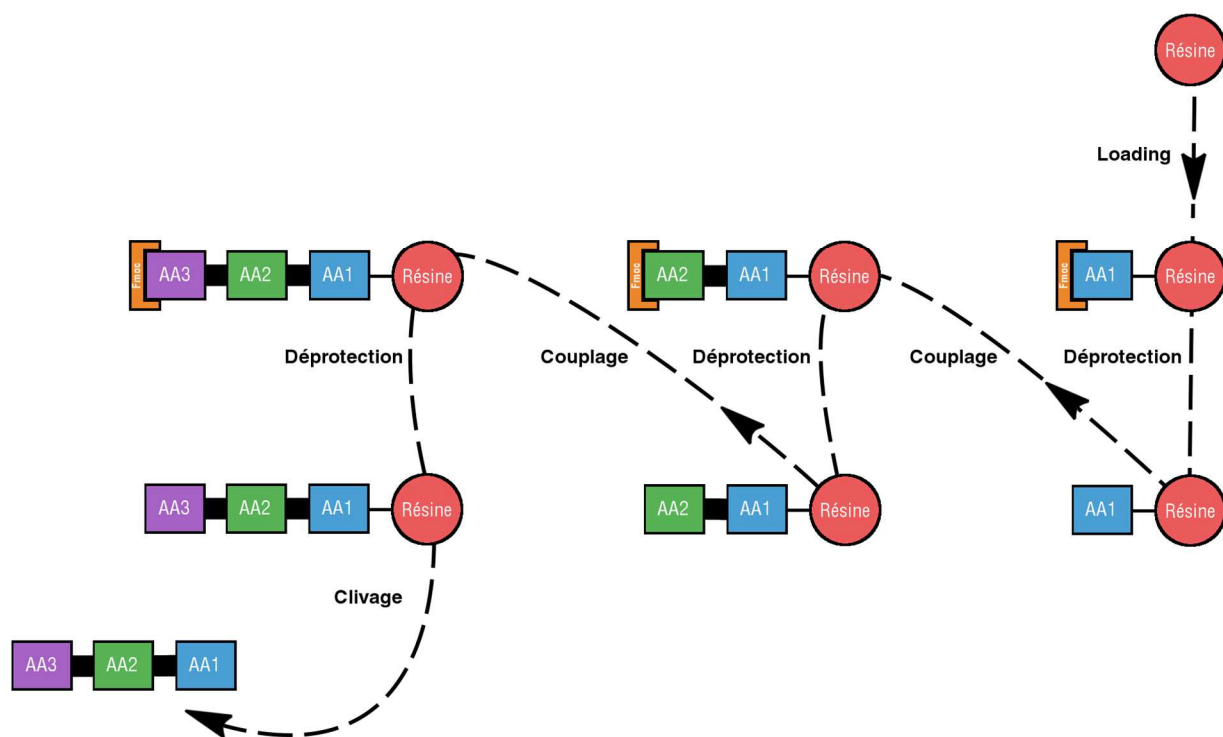
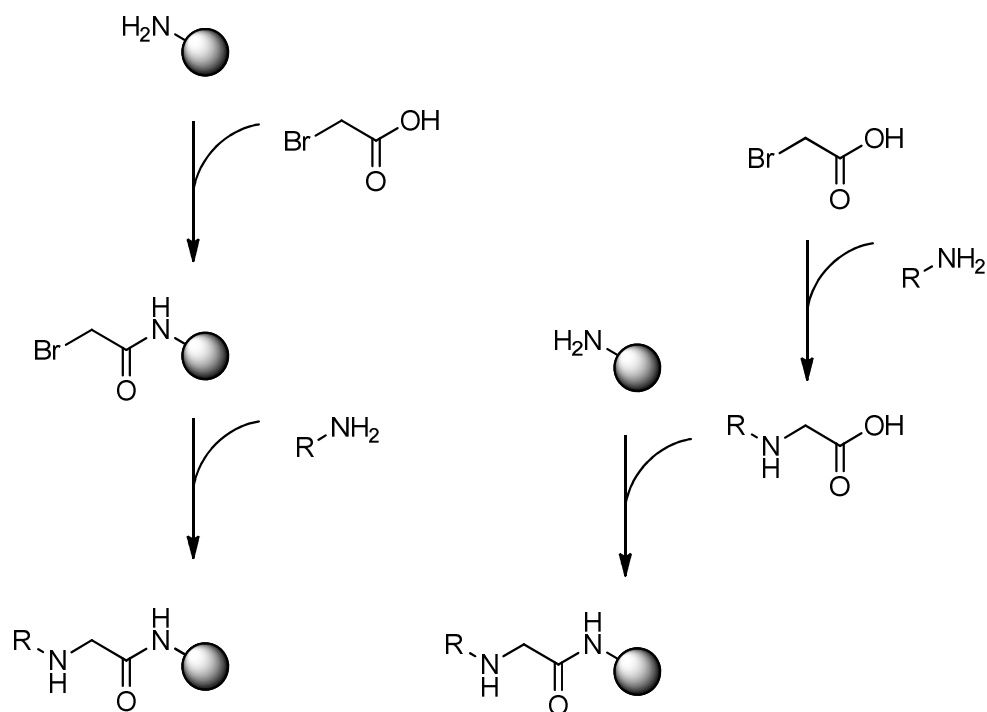


Figure 29 : Synthèse sur phase solide

Une particularité de ce projet par rapport à la phase solide était l'incorporation de peptoides. Pour ce faire, il existe deux principales stratégies (Figure 30) : le couplage d'un acide aminé déjà N-alkylé (stratégie par monomères) ou le couplage d'un acide haloacétique, suivi du déplacement par une amine (stratégie par sous-monomères).^{186–188} Dans les deux cas, ces stratégies sont compatibles avec le reste de la synthèse en phase solide.



Stratégie par sous-monomères

Stratégie par monomères

Figure 30 : Deux méthodes d'incorporation de peptoides sur support solide.

L'avantage d'utiliser la stratégie par sous-monomères est que toute la synthèse peut être faite sur support solide alors que la stratégie par monomères implique une étape en phase liquide.

I.5.6. Macrocyclisation

L'étape finale de macrocyclisation nécessite des conditions de haute dilution pour minimiser le couplage intermoléculaire. Il existe une grande variété d'agents de couplage, mais la macrocyclisation peut parfois être difficile à réaliser : on rapporte souvent des problèmes de dimérisation, de polymérisation, de couplages lents et d'épimérisation.¹⁸⁹ L'épimérisation en question (Figure 31) est également la raison pour laquelle les couplages par fragments sont généralement évités. La présence d'un amide à proximité de l'ester activé peut entraîner la formation de l'oxazolone et donc l'érosion de la chiralité.^{181,189,190}

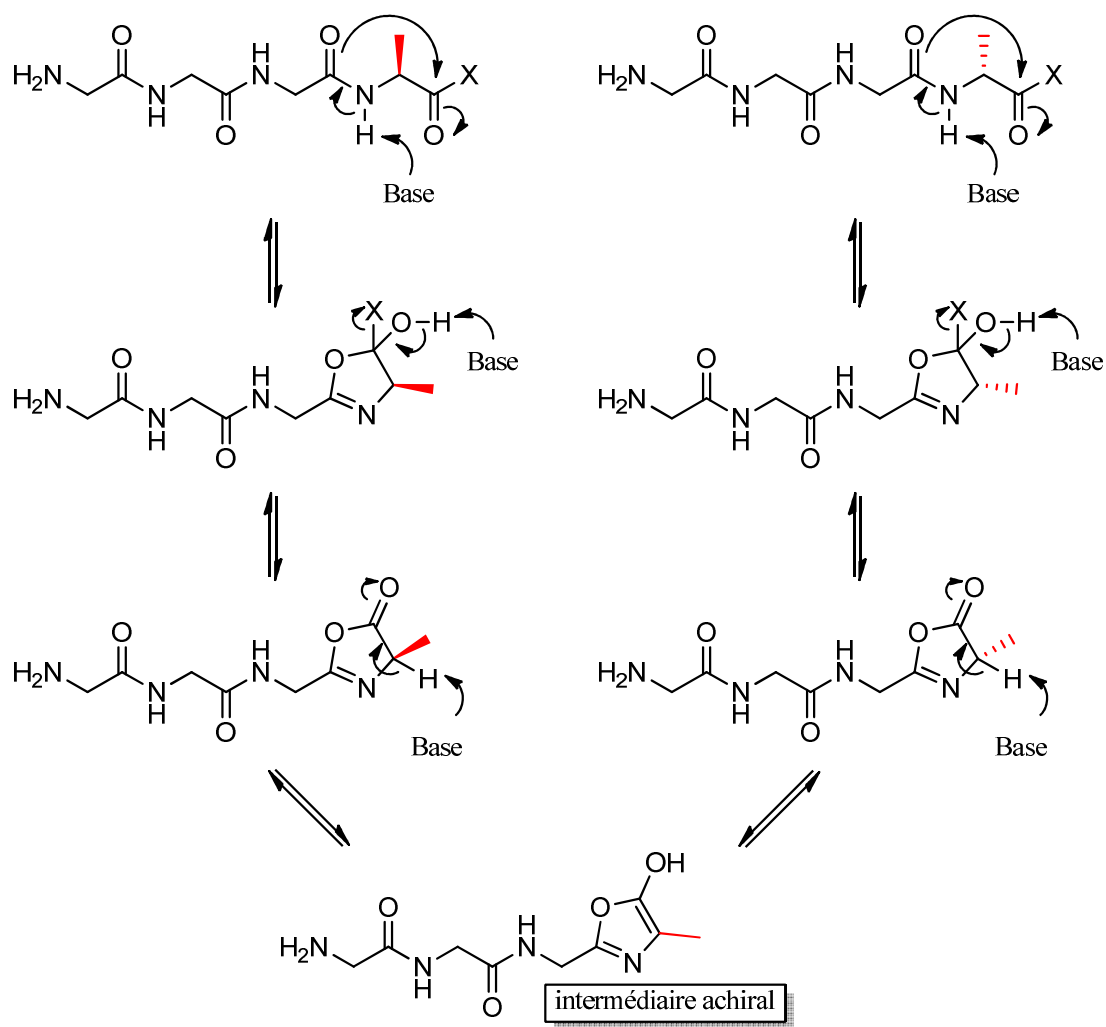


Figure 31 : Mécanisme d'épimérisation d'un fragment comprenant un ester activé.

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE

Dans ce premier chapitre, les synthèses des chaînons seront présentées, suivies de la synthèse sur support solide et de la macrocyclisation. Il est à noter que les rendements indiqués sont des moyennes excluant les premiers essais d'optimisation. De plus, l'approche utilisée visait surtout à produire les chaînons cibles et non à maximiser les rendements. Afin de simplifier les schémas réactionnels, seul un énantiomère est présenté et numéroté, mais toutes les synthèses ont été faites pour les deux énantiomères.

II.1 Synthèse des chaînons

II.1.1 Hydrogénation asymétrique

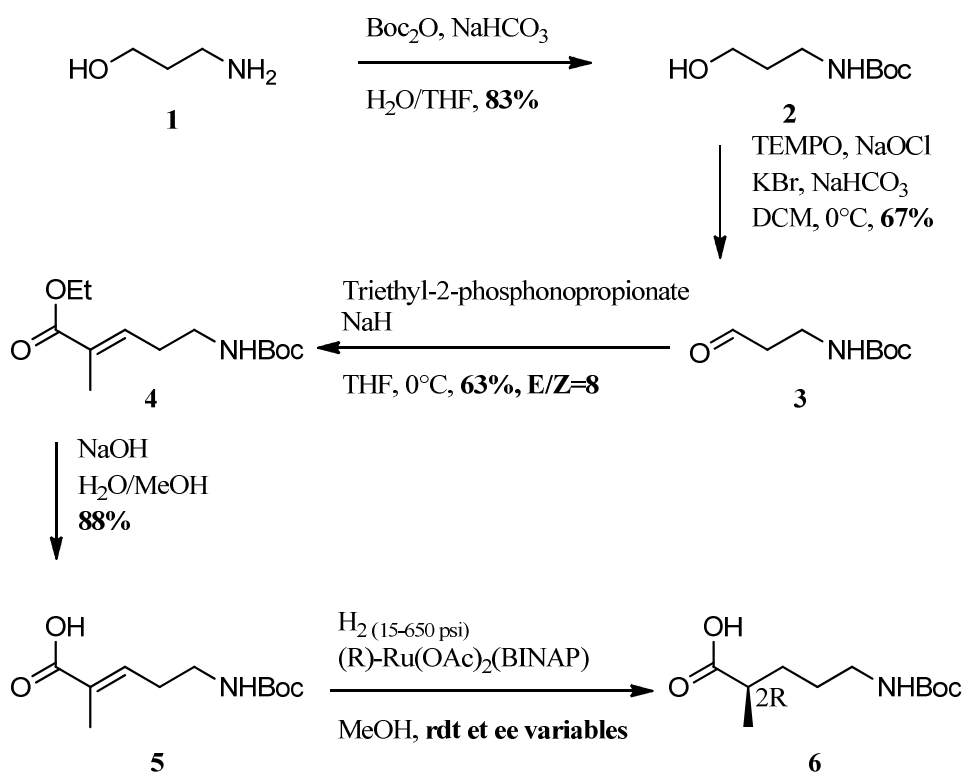


Schéma 1 : Synthèse du chaînon substitué en position 2 par hydrogénation asymétrique.

L'amine du 3-amino-1-propanol **1** a été protégée par un carbamate *tert*-butoxycarbonyle (Boc). L'alcool résultant **2** a été oxydé en l'aldéhyde **3** avec le système TEMPO/NaOCl développé par Anelli¹⁹¹, puis homologué par la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons pour obtenir le composé **4** dans un rapport E/Z d'environ 8 et le produit majoritaire (E) a été isolé par chromatographie.¹⁹² Une hydrolyse

basique de ce produit a conduit à l'acide carboxylique **5**. Bien que l'hydrogénation asymétrique clé n'ait pas été rapportée pour des composés contenant un carbamate, ni même de l'azote, les excès énantiomériques rapportés pour les composés publiés étaient très élevés, ce qui était encourageant.¹⁸² Les mesures d'énantiosélectivité ont été faites en couplant une partie du produit à la méthylbenzylamine chirale et par analyse UV de la proportion des deux diastéréoisomères formés. En utilisant l'acide de Mosher, il a été possible d'émettre une hypothèse sur la stéréochimie majoritaire qui correspondait avec le résultat attendu.¹⁹³ La relation obtenue entre l'excès énantiomérique et la pression (Figure 32) laissait espérer de meilleurs excès à basse pression, mais dans ce cas, la conversion observée était basse, même après plusieurs jours. Comme il aurait été difficile de séparer le chaînon hydrogéné du produit de départ non hydrogéné, cette voie de synthèse a été jugée impraticable. Des essais de précipitation ont été faits afin d'augmenter la pureté optique, mais sans succès. De même, l'acide a été estérifié avec le menthol dans l'optique d'obtenir des diastéréoisomères plus faciles à séparer (Schéma 2), mais également sans succès, car aucune séparation n'a pu être observée par chromatographie.

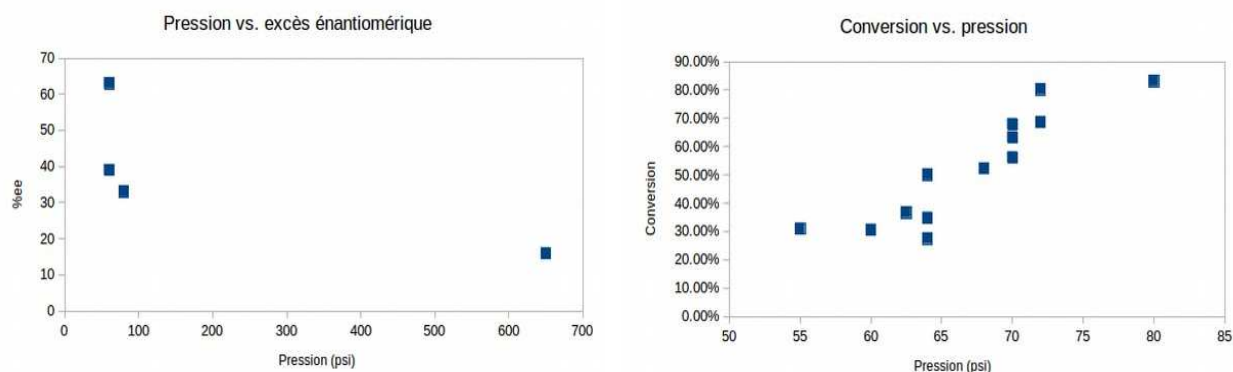


Figure 32 : Relation entre pression et résultats obtenus.

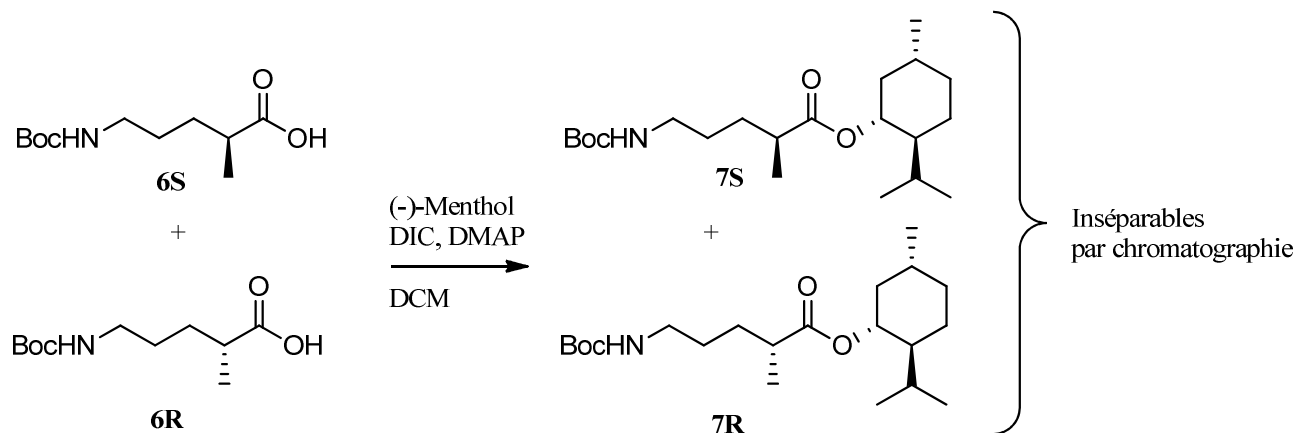


Schéma 2 : Essai de séparation par formation de diastéréoisomères.

II.1.2 Chaînon méthylé en position 2

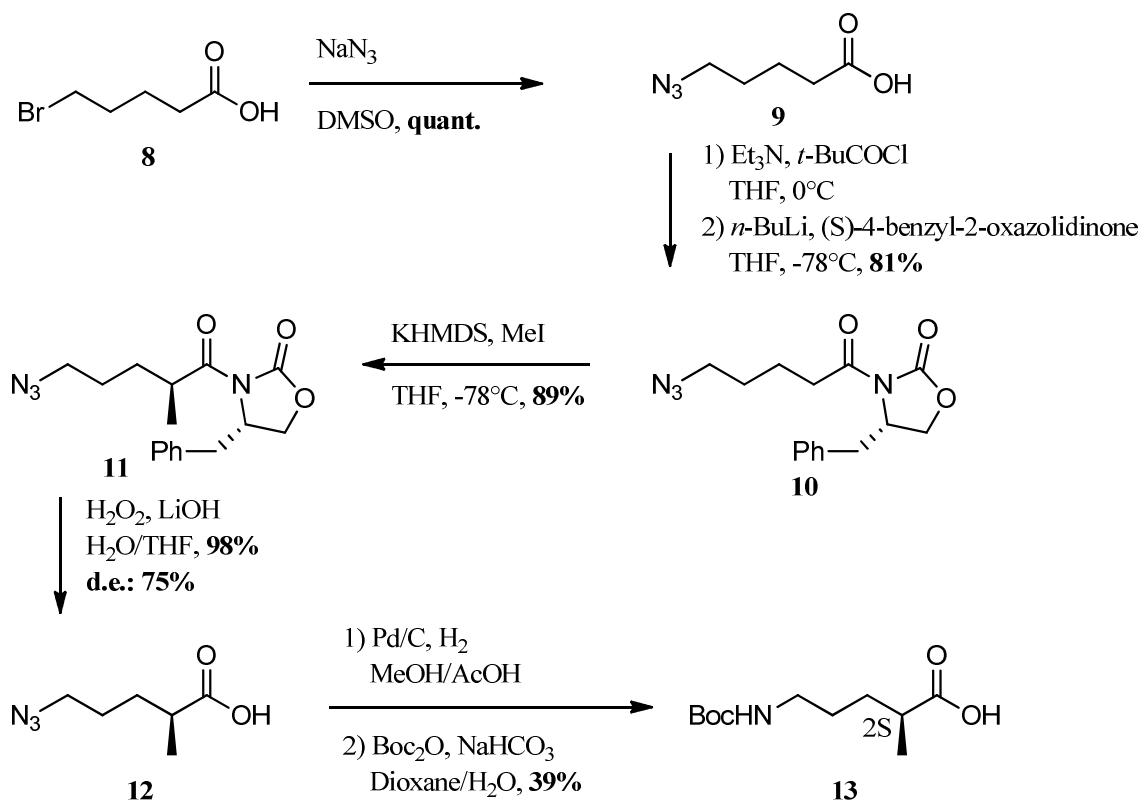


Schéma 3: Synthèse du chaînon substitué en position 2 par oxazolidinone.

Cette stratégie de synthèse se basait sur celle adoptée par le groupe Thomas A. Dix pour synthétiser des analogues α -méthylés de l'arginine et de la lysine.¹⁸³ La première étape consistait en un déplacement nucléophile du bromure **8** en l'azoture **9**. L'auxiliaire chiral a ensuite été installé en formant d'abord

l'anhydride mixte du *tert*-butoxycarbone, puis en le déplaçant avec l'oxazolidinone déprotonée.¹⁹⁴ Le produit **10** ainsi obtenu a été alkylé à l'iodométhane pour obtenir le produit **11**, dont la pureté diastéréomérique a pu être déterminée par RMN, mais les diastéréoisomères n'ont pas pu être séparés par chromatographie. En supposant que les étapes subséquentes d'hydrolyse, d'hydrogénation et de protection ne causent pas d'érosion, cette valeur d'excès diastéréomérique a pu être utilisée comme approximation de l'excès énantiomérique du chaînon final. Il est à noter que cette alkylation a d'abord été essayée en utilisant le LiHMDS comme base, puis le NaHMDS et que dans les deux cas, très peu de produit attendu a été formé tandis que KHMDS s'est révélé efficace. L'hydrolyse exocyclique en **12** avec le LiOOH a fonctionné dans d'excellents rendements.¹⁹⁵ Les deux dernières étapes consistaient à réduire l'azoture en amine, puis à la protéger avec un carbamate Boc. Ces étapes ont été réalisées successivement sans isoler l'acide aminé déprotégé, car sa nature facilement ionisable le rendait difficile à isoler par chromatographie. Ceci explique peut-être les faibles rendements obtenus pour la conversion de **12** en **13**.

II.1.3 Chaînon méthylé en position 3

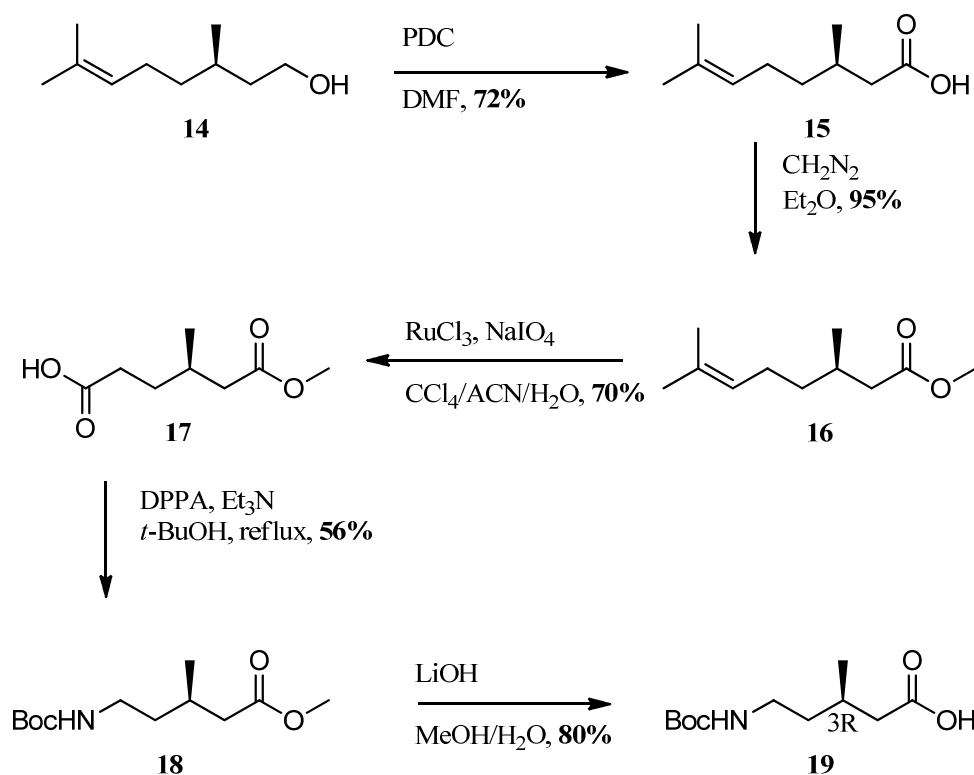


Schéma 4 : Synthèse du chaînon substitué en position 3.

Le citronellol possède deux fonctions entourant le méthyle chiral : un alcène et un alcool. On voulait former un acide et un carbamate à partir de ces deux fonctions. Dans le cas du méthyle en position 3, on a d'abord choisi d'oxyder l'alcool en acide d'une part, et d'autre part de transformer l'alcène en carbamate. Cette dernière transformation s'est faite en deux étapes : le clivage oxydatif suivi du réarrangement de Curtius.¹⁹⁶

Une première approche consistait à cliver la double liaison, effectuer le réarrangement de Curtius, puis oxyder l'alcool en acide, sans groupement protecteur. Cependant, l'ozonolyse sur **14** n'a jamais donné de bons rendements et ne fonctionnait souvent pas du tout. Une solution de remplacement était le clivage au tétr oxyde de ruthénium, qui a fonctionné ici avec de bons rendements.¹⁹⁷ Par contre, ces conditions sont extrêmement fortes et oxydent aussi les alcools en acides. C'est pourquoi il a été préféré de commencer par produire l'acide (**15**), puis le protéger (**16**) afin de pouvoir faire le réarrangement de Curtius sur un seul acide.

De façon surprenante, le (S)-citronellol est beaucoup moins cher que le (R)-citronellol et à l'inverse, l'acide (R)-citronellique est moins cher que l'acide (S)-citronellique. Comme l'oxydation d'un alcool à un acide semblait être une réaction assez simple, il a été décidé d'oxyder le (S)-citronellol et utiliser l'acide (R)-citronellique directement. Cependant, il s'est avéré difficile d'obtenir de bons rendements pour l'oxydation de **14** à **15**. Les conditions de Jones ont été utilisées dans un premier temps, avec des rendements n'excédant jamais 50 %. Il est possible que, rendu à l'aldéhyde, une réaction de type Prins (Schéma 5) se produise, car le réactif de Jones contient un grand pourcentage d'acide sulfurique.¹⁹⁸ Afin d'améliorer le rendement de cette réaction, d'autres méthodes ont été explorées. L'oxydation de l'alcool à l'aldéhyde avec le periodinane de Dess-Martin¹⁹⁹ a toujours donné d'excellents rendements, mais l'étape subséquente d'oxydation à l'acide carboxylique était problématique (Tableau 5). Toutes les conditions essayées (KMnO₄²⁰⁰, Ag₂O²⁰¹, Oxone²⁰²) n'ont donné que de faibles rendements. Finalement, l'oxydation directe de l'alcool à l'acide utilisant le dichromate de pyridinium dans le DMF²⁰³ a fonctionné avec des rendements supérieurs à 70 %.

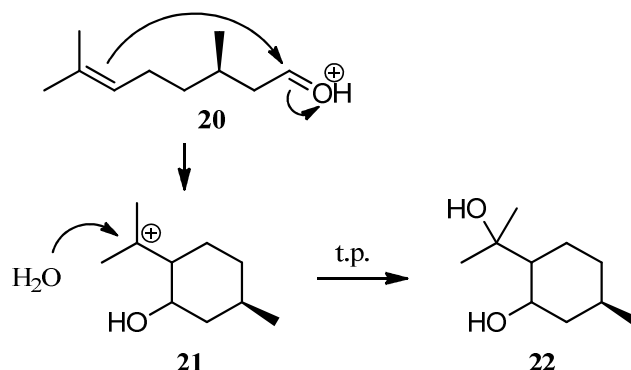


Schéma 5 : Réaction secondaire possible de type Prins.

Tableau 5

Conditions	Résultats
Jones	15-46% (13x)
DMP, puis oxone	Pas de produit attendu (1x)
DMP, puis AgNO ₃	20-26% (2x)
PDC/DMF	66-72% (2x)

L'étape suivante a elle aussi demandé une certaine optimisation (Tableau 6). L'estérification de **15** en **16** a d'abord été tentée à l'aide du sulfate de diméthyle^{204,205}, avec un brut réactionnel complexe. Deux autres essais ont été faits avec le chlorure de thionyle²⁰⁶, puis avec le chlorure d'acétyle²⁰⁷ dans le méthanol, mais la RMN du brut réactionnel montrait la disparition du signal de l'alcène. Il a été supposé que l'acide chlorhydrique généré pouvait là aussi promouvoir une cyclisation ou une dimérisation, assez typiques dans la chimie des terpènes.^{208,209} Finalement, la méthylation de l'acide avec le diazométhane²¹⁰ a donné le produit désiré dans des rendements quasi quantitatifs.

Tableau 6

Conditions	Résultats
DMS	Brut réactionnel complexe
SOCl ₂ /MeOH	Pas de signal d'alcène
AcCl/MeOH	Pas de signal d'alcène
CH ₂ N ₂	75-100%

II.1.4 Chaînon méthylé en position 4

Pour le chaînon portant un méthyle en position 4 (Schéma 6), la première étape consistait en un réarrangement de Curtius de l'acide citronellique, obtenu de la même façon que décrit pour le chaînon méthylé en position 3.²¹¹ Les conditions modernes de Curtius utilisant l'azoture de diphénylphosphoryle n'ont pas généré le produit attendu, possiblement encore dû à la réactivité de l'alcène trisubstitué qui possède un caractère particulièrement nucléophile vu la stabilité du carbocation tertiaire résultant (*i.e.* Schéma 5, molécule **21**).²¹² Des conditions de réaction plus douces développées par Hélène Lebel²¹³ ont permis d'obtenir le carbamate **23**, bien qu'avec des rendements modestes.

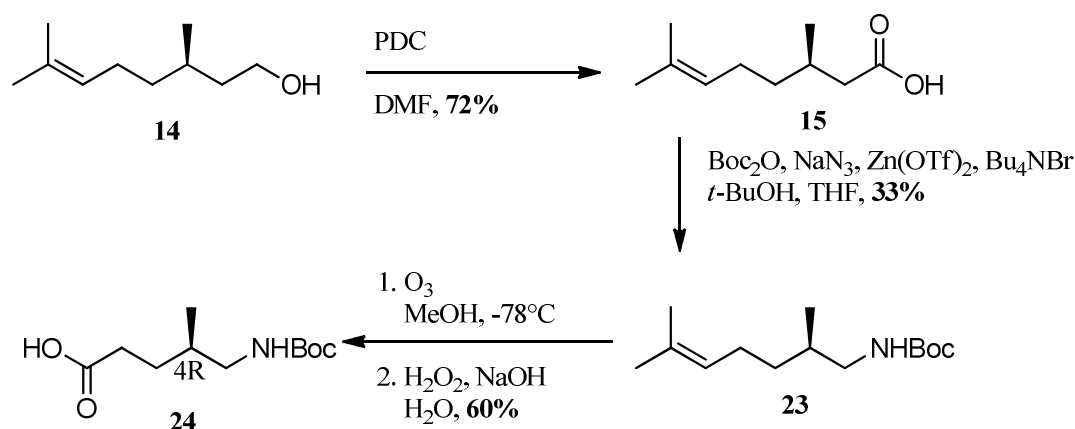


Schéma 6 : Synthèse de 4-Me.

L'étape suivante était le clivage oxydatif, réalisé par ozonolyse avec parachèvement oxydant pour obtenir **24**. Étonnamment, peu d'exemples se trouvent dans la littérature pour l'ozonolyse jusqu'à l'acide. On retrouve majoritairement des parachèvements réducteurs suivis d'oxydations. Les premiers essais ont été faits à partir des quelques exemples trouvés, mettant en jeu l'ajout de peroxyde d'hydrogène puis un chauffage à reflux.^{214,215} Les rendements observés étaient inférieurs à 30 % et le changement de solvant avant le parachèvement oxydatif nécessitait des précautions particulières : l'évaporation du solvant utilisé pour l'ozonolyse implique l'isolation d'espèces intermédiaires réactives (*e.g.* ozonides), il était donc nécessaire de conserver le ballon à -30°C et d'utiliser un condensateur refroidi à la carboglace. Une première modification à ce protocole a été d'utiliser le méthanol comme solvant d'ozonolyse. Non seulement pour éviter le changement de solvant, mais l'ozonolyse dans le méthanol est également connue pour générer des espèces moins réactives.²¹⁶ Afin d'optimiser le parachèvement, la réaction a d'abord été tentée à température ambiante plutôt qu'à reflux. Moins de sous-produits ont été observés, mais la réaction procédait lentement. Une solution d'hydroxyde de sodium a été ajoutée avec l'intention de

généraliser un maximum d'anions peroxyde; ces nouvelles conditions ont fonctionné avec des rendements encore une fois modestes, mais plus élevés, allant jusqu'à 60 %.

II.1.5 Chaînon méthylé en position 5

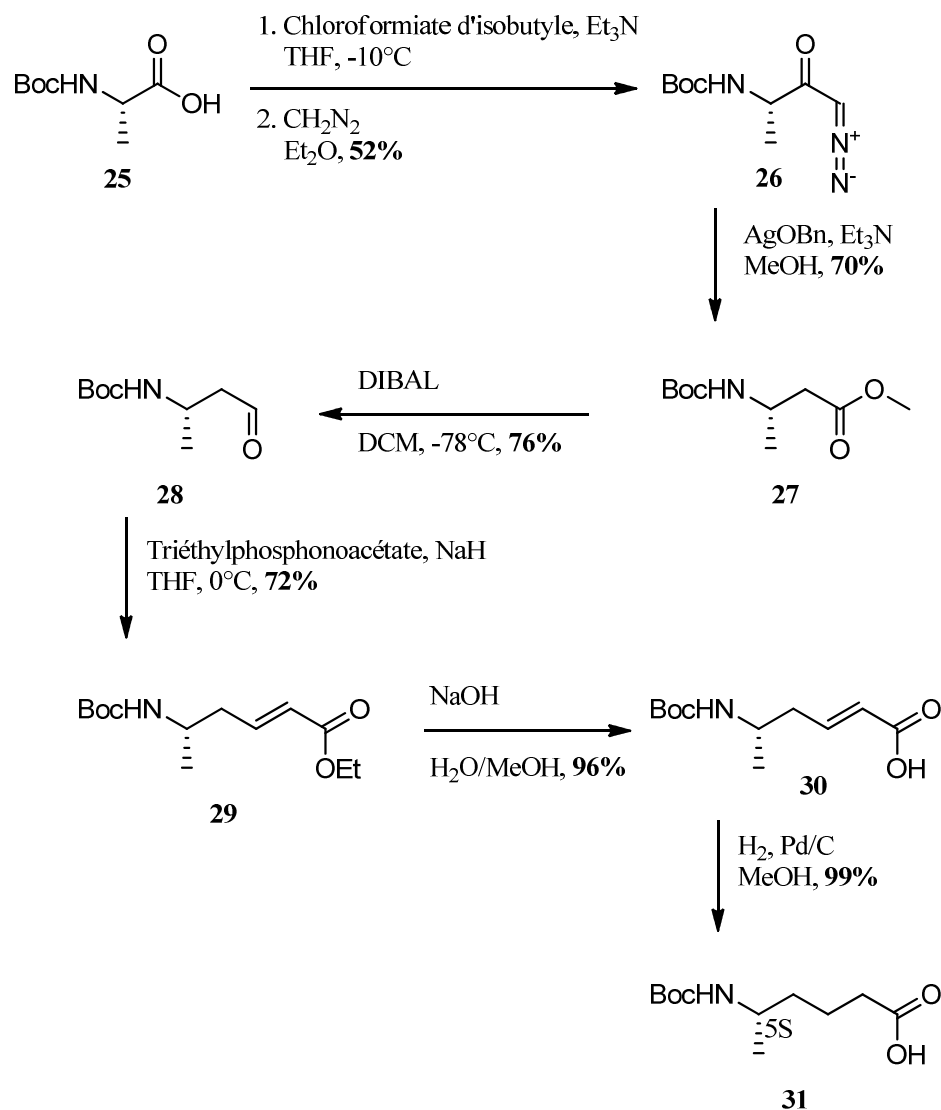


Schéma 7 : Synthèse du chaînon méthylé en position 5.

La source de chiralité et le produit de départ pour le chaînon méthylé en position 5 était l'alanine **25**. La réaction de Arndt-Eistert a été considérée comme première réaction d'homologation, puisqu'elle est connue pour ne pas causer d'érosion de la pureté optique.^{217,218} Il s'agit d'une réaction en deux étapes avec une diazocétone comme intermédiaire. Pour le premier essai, l'intermédiaire **26** n'a pas été isolé, mais le rendement final était bas et on retrouvait également l'ester méthylique non homologué. C'est

pourquoi il a été jugé préférable d'isoler la diazocétone avant de procéder au réarrangement de Wolff. Il est intéressant de noter qu'il est possible de faire ce réarrangement dans un alcool pour obtenir l'ester correspondant (**27**).²¹⁹ Un aldéhyde étant nécessaire pour procéder à l'oléfination de Wittig suivante, l'ester avait la particularité d'être réductible à l'aldéhyde **28** en utilisant le DIBAL.^{220,221} L'oléfination avec le triéthylphosphonoacétate a produit le composé **29**, dont le ratio E/Z n'a pas été déterminé puisqu'après l'hydrolyse vers **30**, le produit est hydrogéné en **31**.

II.2 Synthèse des précurseurs linéaires sur phase solide

La synthèse sur phase solide s'est déroulée de façon typique en utilisant la résine de Wang et une stratégie Fmoc. L'incorporation des peptoides s'est faite de différentes façons selon le cas. Pour le peptotide de l'alanine, des essais préliminaires ont été faits avec la synthèse par sous-monomères (*i.e.* couplage de l'acide bromoacétique suivi de déplacement par la méthylamine), mais cette méthode s'est avérée superflue dans ce cas particulier, vu la disponibilité commerciale de la sarcosine (Figure 25).

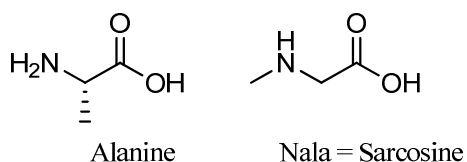


Figure 33 : Le peptotide de l'alanine est la sarcosine.

Dans le cas des peptoides de la phénylalanine et de la leucine, c'est la synthèse par sous-monomères qui a été utilisée.¹⁸⁸ Cependant, un problème est survenu avec le peptotide de la phénylalanine. Il est commun de procéder à des « mini-clivages » après les couplages réalisés sur support solide. Une partie de la résine est clivée afin de jauger la présence et la pureté du peptide en construction. Dans le cas des peptoides de la phénylalanine, le mini-clivage suivant l'attachement de l'alanine ne montrait que très peu de signal. Après investigation, on a supposé que placer un acide aminé N-alkylé en position C-terminale suivi d'une leucine menait à la formation de dicétopipérazine et donc du clivage de la résine (Figure 26). Cette réaction secondaire est typique de certaines séquences, notamment celles contenant une proline comme premier aminé, puisque c'est la forme *cis* qui permet l'attaque de l'amine sur l'ester.²²²

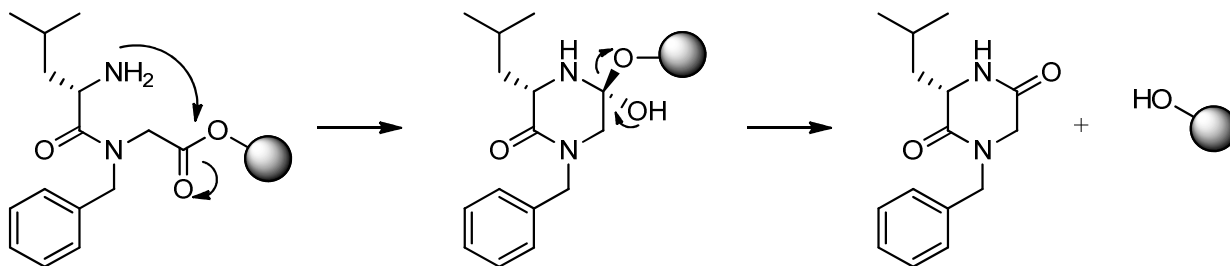


Figure 34 : Formation de dicétopipérazine lors de la déprotection.

Afin d'atténuer ce problème, une résine plus encombrée, la 2-chloro-chlorotrityle, a été utilisée (Figure 27).²²³ Ceci n'a toutefois pas été suffisant et le couplage entre l'alanine et la leucine a été fait en solution au préalable, afin d'éviter de passer par une amine libre. Dans ces conditions, la synthèse semblait se passer sans formation de dicétopipérazine, mais un nouveau problème est survenu. Une fois la macrocyclisation réalisée, il semblait s'agir d'un mélange de diastéréoisomères par UPLC-MS. Il est possible qu'il y ait eu racémisation partielle lors du couplage du dipeptide. C'est en fait pour cette raison qu'on préfère généralement coupler des monomères (voir Figure 24).²²⁴ Finalement, le protocole a été optimisé de façon à minimiser la formation de dicétopipérazine. La déprotection rapide (2 x 30 s) de la leucine s'est avérée être la solution. En utilisant 20 % pipéridine/DMF + HOBt (0.1 M), une déprotection complète est observée et conserve approximativement 50 % du loading initial.²²² Les mesures de loading ont été effectuées avec un spectromètre UV. Pour ce faire, une quantité précise de résine (environ 10 mg) est pesée, puis déprotégée. La solution résultante contient du dibenzofulvène, dont l'absorption dans l'UV (à 290 et 301 nm), comparée à une courbe étalon, est proportionnelle à sa concentration.²²⁵

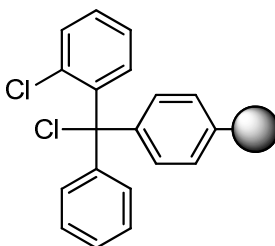


Figure 35 : Résine 2-chloro-chlorotrityl.

II.2.1. Macrocyclisation et purification

Le laboratoire du Pr. Éric Marsault bénéficie d'une grande expertise en macrocyclisation.^{127,226–228} L'agent de couplage utilisé – le 3-(diéthoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one (DEPBT, Figure 28) – est connu pour causer très peu d'épimérisation.^{229,230} De nombreux exemples dans la littérature rapportent l'utilisation de cet agent de couplage pour des séquences difficiles soit en matière d'épimérisation ou de rendement.^{175,189,231–233}

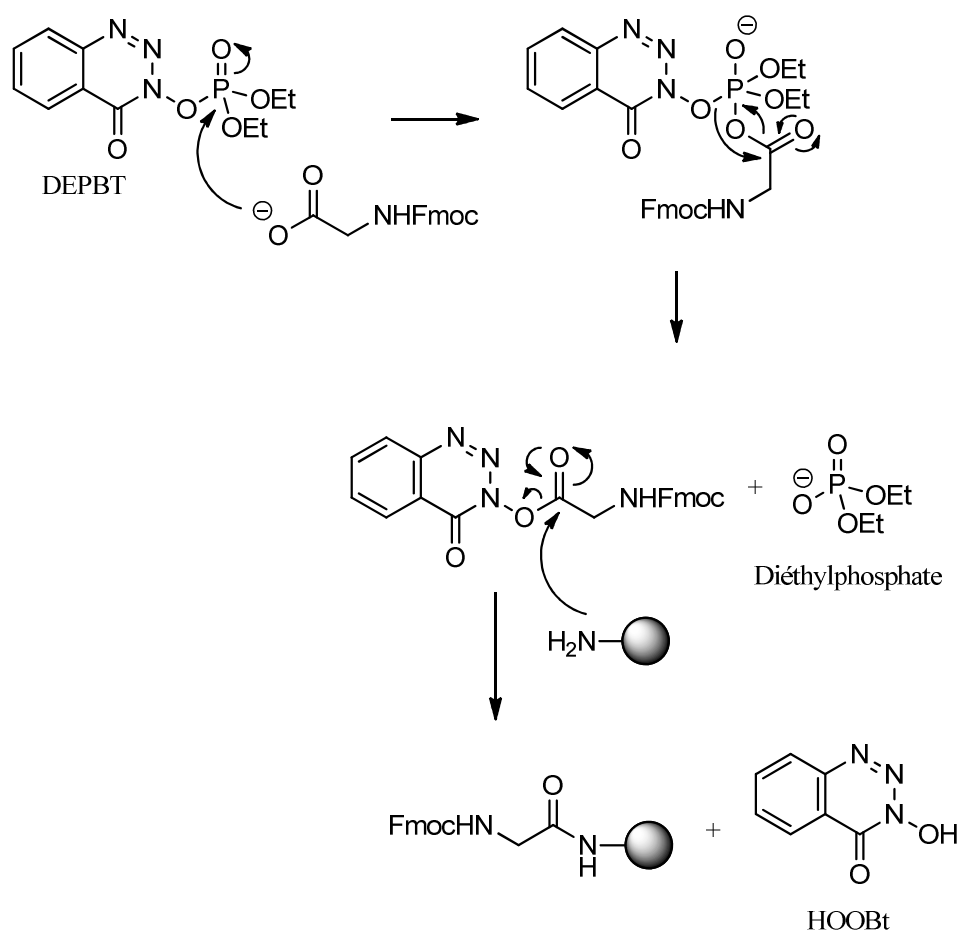


Figure 36 : Mécanisme de couplage avec DEPBT.²³⁴

Avec une concentration réactionnelle de 0.025 mmol/L, très peu de couplage intermoléculaire a été observé. Afin d'assurer l'achèvement de la réaction, elle a été laissée de deux à trois jours. Évidemment, la macrocyclisation étant une réaction unimoléculaire, une haute dilution est généralement préférée afin de défavoriser la formation de dimères ou autres oligomères.^{126,235} Le brut réactionnel est filtré sur une cartouche de silice fonctionnalisée par un cation ammonium quaternaire, ce qui enlève les sous-produits anioniques tels que le précurseur linéaire (fonction acide), le HOObt et le diéthylphosphate, sous-produits du DEPBT.

La purification finale des macrocycles a été effectuée sur HPLC préparative. Les fractions pures ont été rassemblées et lyophilisées. Il a été observé dans certains cas que la resolubilisation était difficile, quel que soit le solvant utilisé. Les premiers macrocycles synthétisés ne comportant aucun méthyle sur le chaînon semblaient assez solubles dans le méthanol et les analyses RMN ont été faites dans ce solvant. Cependant, certains macrocycles semblaient être moins solubles, voire insolubles dans ce solvant. Il a donc été nécessaire d'utiliser le DMSO, qui présente le désavantage d'être difficile à enlever. Un certain pourcentage (généralement $\leq 1\%$) est toutefois jugé acceptable dans les tests de perméabilité.^{236,237} Au total, 38 macrocycles ont été synthétisés (Figure 37).

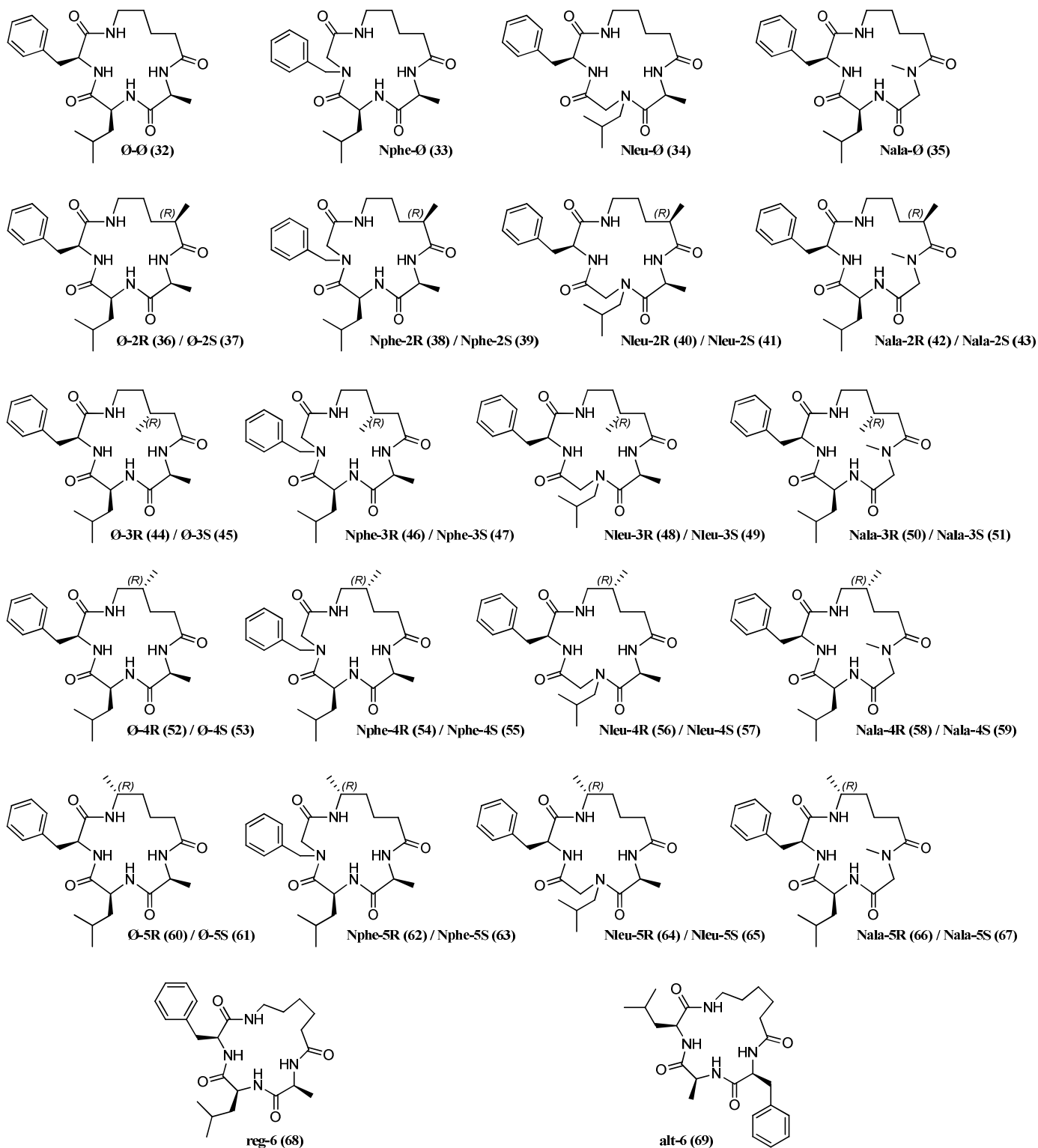


Figure 37 : Ensemble des macrocycles synthétisés

CHAPITRE 2 : TESTS DE PERMÉABILITÉ

III.1. PAMPA

III.1.1. Premier essai à Montréal

Comme il s'agissait d'un essai encore jamais réalisé à l'institut de pharmacologie de Sherbrooke, l'aide du Pr. Grégoire Leclair de l'Université de Montréal a été sollicitée. Son laboratoire est en effet spécialisé dans la formulation et l'étude de biodisponibilité des médicaments.^{238–240} L'élaboration d'un protocole expérimental et analytique a commencé par un test de détection et de stabilité de certains des composés (Figure 38). Bien que les essais PAMPA soient souvent quantifiés à partir de l'absorption UV^{44,55}, ce premier test a montré que cette option n'était pas la plus sensible. Une meilleure sensibilité a effectivement été obtenue en spectrométrie de masse. Pour obtenir des résultats linéaires sur une plage de concentration intéressante, il a été nécessaire d'utiliser un tampon phosphate. De plus, pour augmenter le ratio signal/bruit et obtenir de meilleures intégrations, la méthode de détection *single ion mode* a été utilisée. Dans cette méthode, seul le taux d'ionisation correspondant au ratio masse sur charge (m/z) du composé voulu est mesuré, ce qui veut dire que la résolution pour la masse cherchée sera meilleure. Après avoir atteint une réponse linéaire, des tests de stabilité thermique ont été faits. Trois composés ont été laissés à trois températures différentes et on a analysé leur concentration après 96 h. Ces conditions simulent le temps pouvant s'écouler entre les essais de perméabilité réalisés à Montréal et l'analyse par UPLC-MS, faite à Sherbrooke.

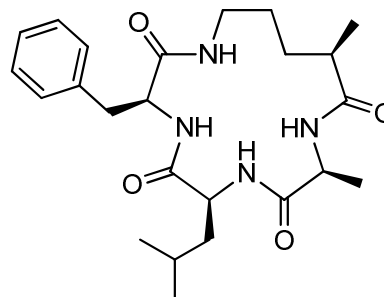
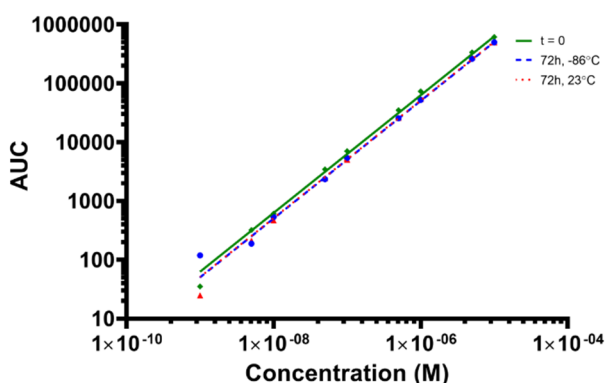


Figure 38 : (**gauche**) Droite dose-réponse du composé Ø-Ø (**droite**). La solution a été analysée tout juste après dilution dans le tampon phosphate ($t = 0$), puis après 72 h à $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ et 72 h à $23\text{ }^{\circ}\text{C}$. Des écarts significatifs apparaissent en dessous de 10 nM, car le pic obtenu est très faible et son intégration inexacte.

Le premier essai a été fait directement à Montréal dans le laboratoire du professeur Leclair. Les composés de référence utilisés étaient le vérapamil (haute perméabilité) et le furosemide (faible perméabilité), dont les structures ont été présentées à la Figure 5. Comme il s'agissait d'un premier essai, seuls les onze composés synthétisés à cette date ont pu être testés (Figure 39). Ce test incluait également deux composés ne faisant pas partie de la librairie comme indiqué plus haut (« reg-6 » et « alt-6 »). Il s'agit de deux composés portant un chaînon linéaire de six carbones plutôt que cinq. Le composé reg-6 garde la même séquence peptidique et le composé alt-6 est cyclisé dans l'ordre Leu-Ala-Phe-Chaînon. Dans tous les essais qui seront présentés, les mesures ont été prises en triplicata, soit trois puits par composé à pH 6.4. Les barres d'erreur indiquées correspondent à l'écart-type. Les balances massiques obtenues pour ce premier essai étaient généralement bonnes, ce qui apportait une certaine validation à l'essai. Seul le vérapamil a présenté une balance massique insuffisante, mais l'effet est toutefois connu pour les composés très lipophiles, dont le vérapamil.²⁴¹ Ces premiers résultats semblaient indiquer avant tout la préférence pour les macrocycles ne contenant aucune substitution peptidique.

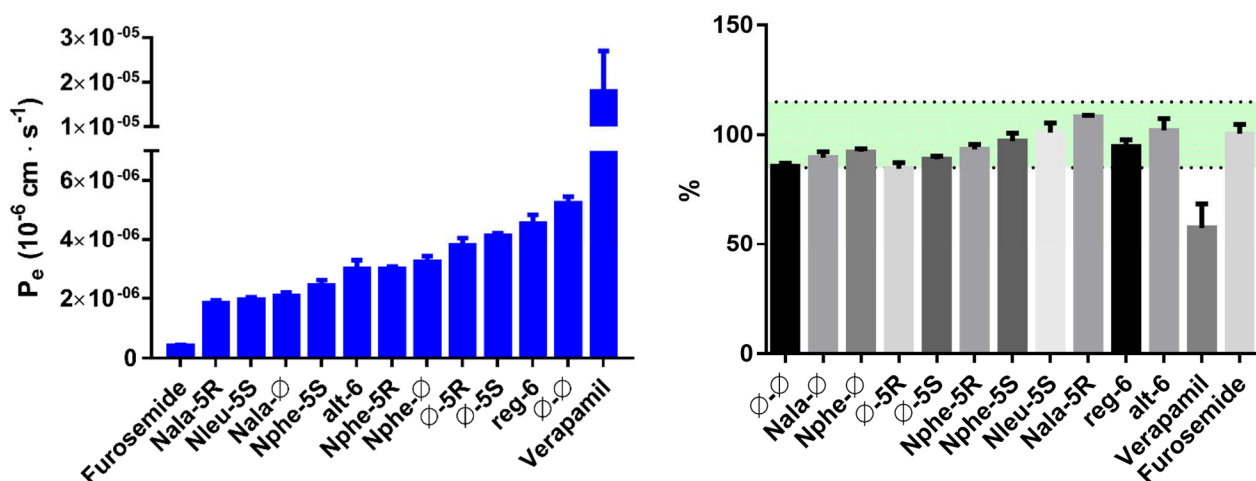


Figure 39 : **(gauche)** Premier essai PAMPA – Montréal. Voir le texte pour une description des composés « reg-6 » et « alt-6 ». **(droite)** Balance massique du premier essai PAMPA.

Une variation de 15 % est généralement considérée comme acceptable.

III.1.2. Essais à Sherbrooke et optimisation

Après avoir synthétisé le reste des composés, le matériel nécessaire aux tests PAMPA a été acheté et quelques tests ont été faits pour s'assurer d'avoir une bonne méthodologie et des résultats similaires à ceux obtenus à Montréal. Un problème de reproductibilité est alors apparu, non seulement entre les valeurs obtenues à Sherbrooke et celles obtenues à Montréal, mais également entre les valeurs obtenues lors de différents essais réalisés au laboratoire. La Figure 40 montre différents essais et compare quatre composés : les deux contrôles et les deux composés présentant les perméabilités extrêmes. La première modification (**13 juin**) a été de prélever le vérapamil (contrôle positif) après 4 h et sans agitation. Cela avait pour but d'éviter d'atteindre l'équilibre osmotique trop rapidement. Cependant, la balance massique du vérapamil (Figure 41) ne s'est pas substantiellement améliorée après la mise en place de ce nouveau point de mesure. Les deux premières expériences réalisées à Sherbrooke ont donné des résultats inattendus où le composé montrant la plus grande perméabilité lors du test de Montréal donnait la plus basse. Ce test a été répété (**15 juin**) et on a pu observer une grande variabilité. Lors de l'essai suivant, un autre changement mineur a été fait (**21 juin**), mais qui semble avoir nettement diminué la variabilité, possiblement au niveau de l'épaisseur de la membrane. En effet, alors qu'à Montréal des embouts de 1-10 μL avaient été utilisés pour appliquer les 10 μL de membrane au fond de chaque puits, des embouts de 10-100 μL avaient été utilisés lors des premiers essais à Sherbrooke. Revenir à ceux de 1-10 μL semble avoir amélioré la reproductibilité (comparer avec **27 juin**).

L'équipe de Pr. Leclair a suggéré d'agiter les plaques afin de réduire l'effet de la couche d'eau non agitée (*unstirred water layer*)⁶⁰, mais l'effet attendu (une hausse de perméabilité) n'a pas vraiment été observé. Un nouveau problème est apparu : la solution de la lécithine utilisée (10 % dans le dodécane) avait tendance à précipiter ou à devenir extrêmement visqueuse. Différentes conditions de stockage ont été essayées : -20°C, 4°C et température ambiante, mais dans aucune il n'a été possible de conserver la membrane en solution et lors de l'application au fond des puits, la reproductibilité (*i.e.* grosseur et consistance de la goutte) était médiocre. La solution adoptée a été de diminuer la concentration en lécithine à 2 % et préparer la membrane pour chaque nouvel essai. Ces nouvelles conditions (**7 octobre**) semblaient assez reproductibles (**8 octobre**) et ont été utilisées pour le test sur l'ensemble des composés (**9 octobre**).

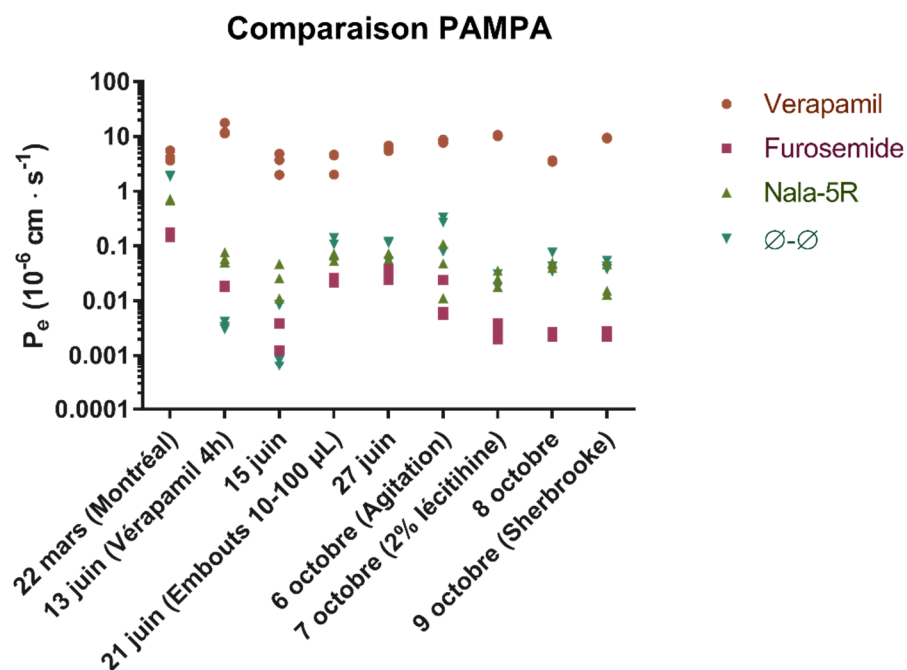


Figure 40 : Comparaison des perméabilités PAMPA obtenues pour quatre composés lors de différents tests. Chaque composé a été testé en triplicata et certains points se superposent. Voir le texte pour une description des différentes expériences.

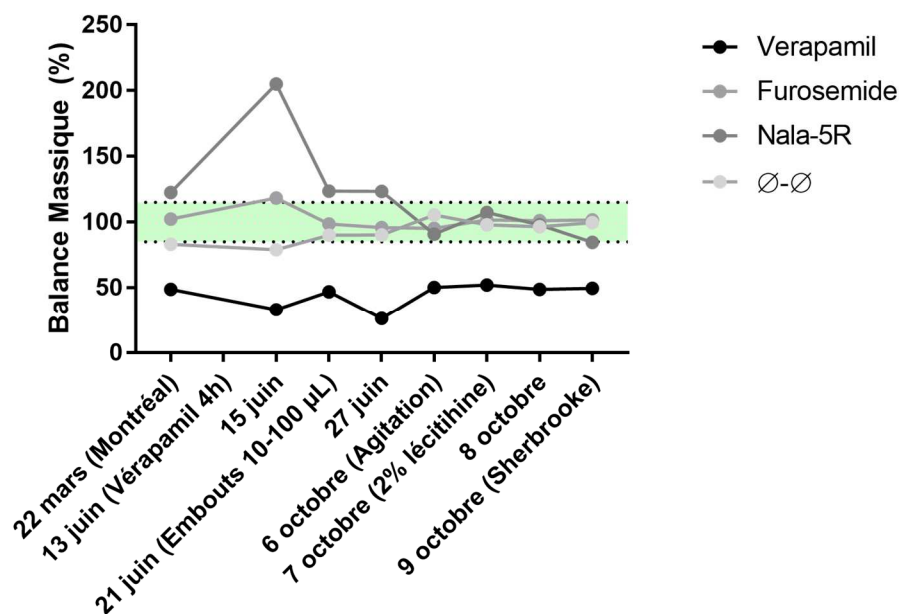


Figure 41 : Balance massique de l'essai PAMPA obtenue pour quatre composés lors des différents tests. Voir le texte pour une description des différentes expériences.

L'essai PAMPA ainsi développé, il a été fait sur l'ensemble des composés sur deux plaques de 96 puits (en triplicata). Les résultats obtenus ont été représentés en ordre croissant de perméabilité (Figure 42) et par une carte de points chauds (*heat map*) classifiant la librairie en fonction des deux modifications structurales (Figure 43).

Une première observation a été faite concernant l'écart entre la plus petite et la plus grande perméabilité : un facteur de plus de 700 (Nleu-5R : 5.38 vs. Nala-2S : 8.27, les valeurs de PAMPA sont présentées sous forme de $-\log(P_e)$), ce qui est très élevé considérant la conservation de la masse moléculaire, du nombre d'atomes polaires et apolaires et de la lipophilicité des composés (Tableau 8). Cet écart se retrouve de part et d'autre du macrocycle \emptyset - \emptyset , suggérant que les modifications apportées puissent avoir un effet positif ou négatif.

Mis en évidence par la représentation en *heat map*, les macrocycles incluant le peptoïde de la leucine présentent généralement de plus hautes perméabilités. On a également remarqué les différences notables entre certains couples d'épimères (*e.g.* Nleu-5R : 5.38 vs. Nleu-5S : 7.25, un facteur de 75). Cependant, de façon générale, la position et stéréochimie du méthyle sur le chaînon ne semble pas avoir un effet important. Aucune position ne ressort comme significativement favorable ou défavorable dans tous les cas.

De façon absolue, les valeurs de perméabilité PAMPA obtenues se trouvent à la limite de ce qui est généralement considéré comme perméant ou non, soit $-\log(P_e) < 6$. En effet, six composés de type Nleu se situent au-delà de cette frontière. De façon empirique, ce seuil marque le point où la perméabilité n'est plus limitante pour la biodisponibilité orale.⁶⁸

La balance massique (Figure 44) montre cependant plusieurs valeurs inférieures au seuil de variation généralement jugé acceptable. Différents facteurs peuvent expliquer cela, il est par exemple possible que certains composés aient une trop grande affinité pour la membrane lipidique et y restent solubilisés. Malgré cela, aucune corrélation n'a été observée entre la balance massique et la perméabilité observée, ce qui donne une certaine validité à l'essai.

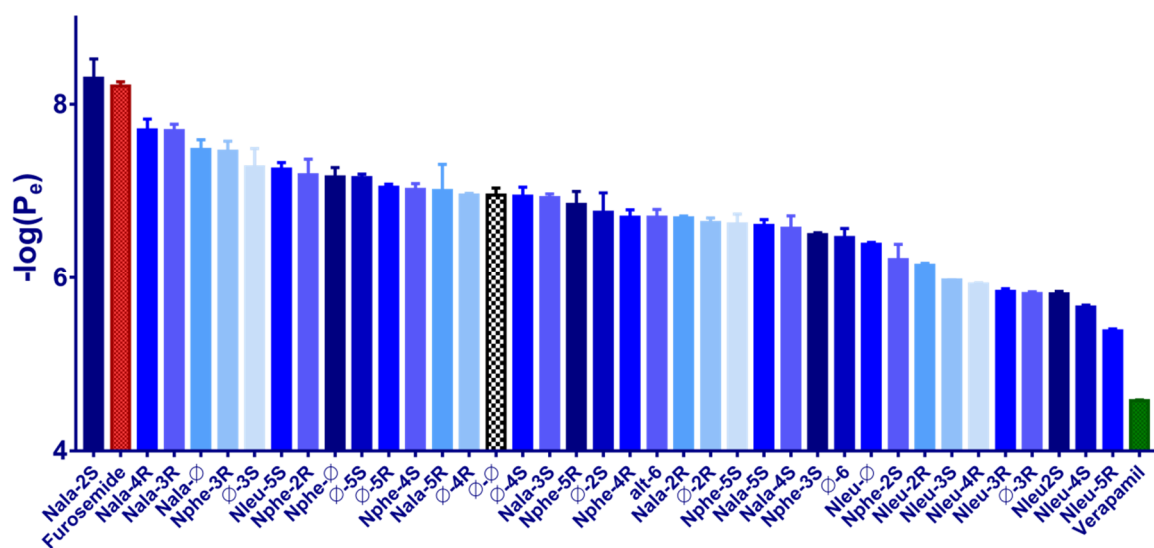


Figure 42 : Essai PAMPA sur les 41 composés, en ordre croissant. Les composés de référence sont représentés en couleur et le macrocycle ne contenant aucun peptotide et aucun méthyle en noir et blanc.

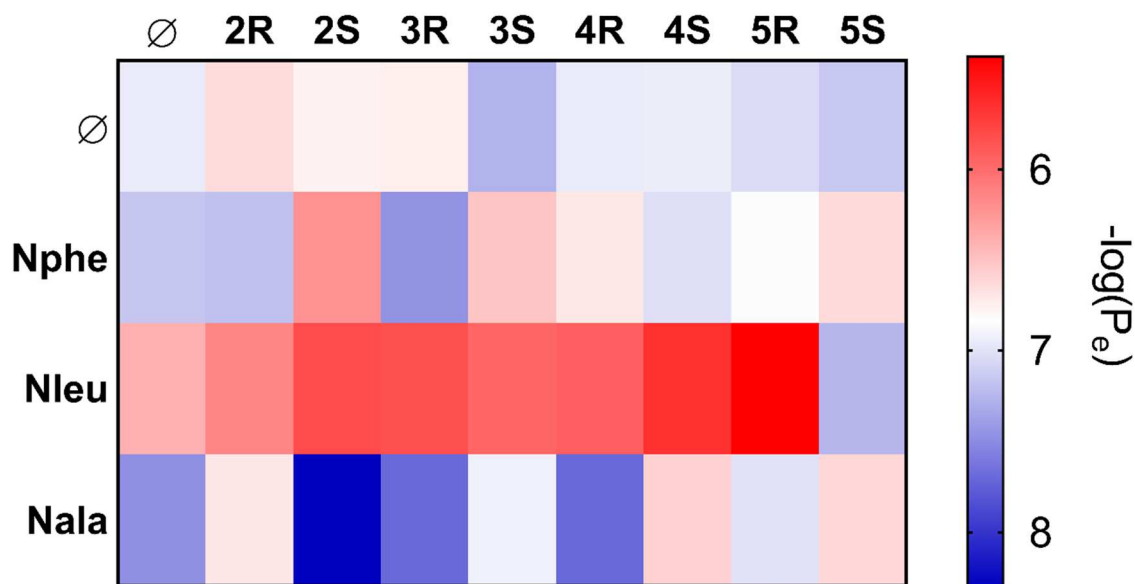


Figure 43 : Heat map PAMPA : La teinte vers le rouge signifie une perméabilité plus élevée. Les valeurs moyennes pour chacun des composés ont été utilisées.

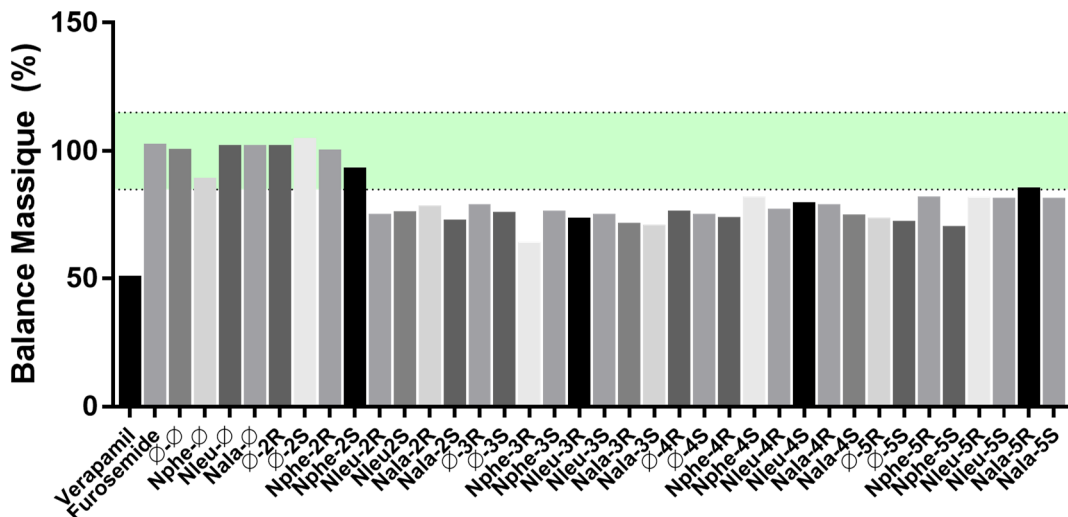


Figure 44 : Balance massique. La majeure partie des composés se situe légèrement sous la zone généralement considérée comme acceptable.

Tableau 8

Composé	MW	cLogP ²⁴²	tPSA ²⁴² (Å ²)	-log(P _e)	Composé	MW	cLogP	tPSA (Å ²)	-log(P _e)
Vérapamil	455	4.33 ⁴³	64	4.576 ± 0.010	Nleu-2S	445	1.35	108	5.806 ± 0.029
Furosémide	331	2.56 ⁴³	119	8.209 ± 0.051	Nleu-3R	445	1.1	108	5.836 ± 0.031
alt-6	445	1.61	116	6.693 ± 0.091	Nleu-3S	445	1.1	108	5.9672 ± 0.0021
Ø-2R	445	1.71	116	6.636 ± 0.055	Nleu-4R	445	1.18	108	5.920 ± 0.015
Ø-2S	445	1.71	116	6.72 ± 0.22	Nleu-4S	445	1.18	108	5.655 ± 0.024
Ø-3R	445	1.45	116	6.742 ± 0.015	Nleu-5R	445	1.23	108	5.380 ± 0.024
Ø-3S	445	1.45	116	7.24 ± 0.21	Nleu-5S	445	1.23	108	7.251 ± 0.075
Ø-4R	445	1.53	116	7.132 ± 0.019 [†]	Nleu-Ø	431	0.81	108	6.392 ± 0.020
Ø-4S	445	1.53	116	6.93 ± 0.10	Ø-Ø	431	1.17	116	6.950 ± 0.081
Ø-5R	445	1.58	116	7.045 ± 0.036	Nphe-2R	445	1.43	108	7.17 ± 0.18
Ø-5S	445	1.58	116	7.330 ± 0.042 [†]	Nphe-2S	445	1.43	108	6.19 ± 0.18
Nala-2R	445	1.36	108	6.692 ± 0.022	Nphe-3R	445	1.18	108	7.45 ± 0.12
Nala-2S	445	1.36	108	8.27 ± 0.22	Nphe-3S	445	1.18	108	6.501 ± 0.021
Nala-3R	445	1.11	108	7.693 ± 0.073	Nphe-4R	445	1.25	108	6.698 ± 0.082
Nala-3S	445	1.11	108	6.924 ± 0.043	Nphe-4S	445	1.25	108	7.018 ± 0.067
Nala-4R	445	1.19	108	7.69 ± 0.13	Nphe-5R	445	1.31	108	6.83 ± 0.15
Nala-4S	445	1.19	108	6.56 ± 0.14	Nphe-5S	445	1.31	108	6.62 ± 0.11
Nala-5R	445	1.24	108	6.93 ± 0.30	Nphe-Ø	431	0.89	108	7.16 ± 0.11
Nala-5S	445	1.24	108	6.780 ± 0.067 [†]	reg-6	445	1.61	116	6.46 ± 0.10
Nala-Ø	431	0.82	108	7.47 ± 0.11	HypA [‡]	445	1.38	108	7.32 ± 0.44
Nleu-2R	445	1.35	108	6.147 ± 0.023	HypB [‡]	445	1.31	108	6.35 ± 0.15

[†]: En duplicata

[‡]: voir section suivante (III.1.3)

Comme des macrocycles sans méthyle et sans substitution peptidique ont été testés, il a été possible d'analyser ces résultats en différents groupes (Figure 45). La première comparaison regarde l'effet global de l'ajout d'un méthyle : la perméabilité moyenne est plus élevée, mais l'écart apparaît comme non

significatif ($P > 0.05$). Considérant la légère contribution d'un méthyle additionnel à la lipophilicité, il est possible que la tendance observée soit due à cet effet. Une comparaison similaire a pu être faite pour la substitution par un peptotide : L'incorporation d'un peptotide semble avoir un effet positif sur la perméabilité, mais l'écart entre les moyennes en ressort également non significatif. Par contre, la comparaison des peptitides de la leucine avec tous les autres composés montre une différence marquée ($P \leq 0.0001$).

Tous ces macrocycles ont des cLogP similaires (Figure 46) et aucune corrélation appréciable n'a pu être observée avec leur perméabilité en PAMPA ($R^2 = 0.006$). La corrélation est meilleure en comparant la perméabilité avec le temps de rétention ($R^2 = 0.20$). Celle-ci se comporte comme attendu : une perméabilité plus élevée est associée à un temps de rétention plus long sur colonne C18.

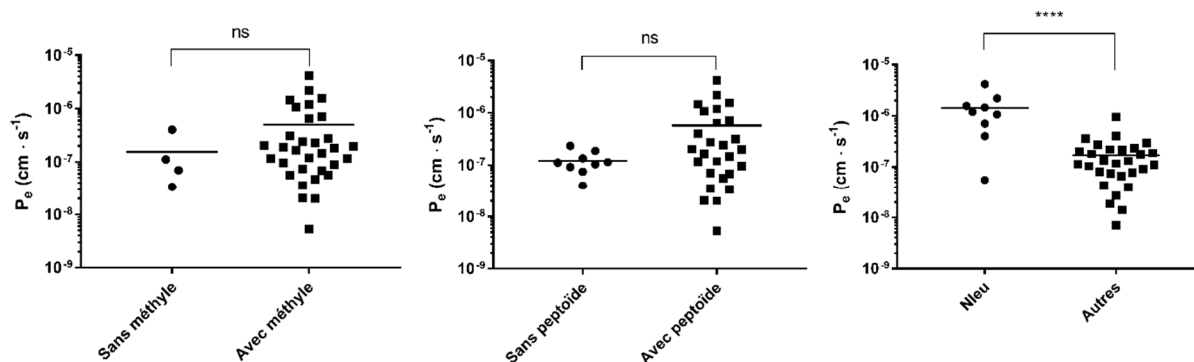


Figure 45 : Effets des modifications structurales sur la perméabilité passive (PAMPA). ns : $P > 0.05$; * : $P \leq 0.05$; **** : $P \leq 0.0001$

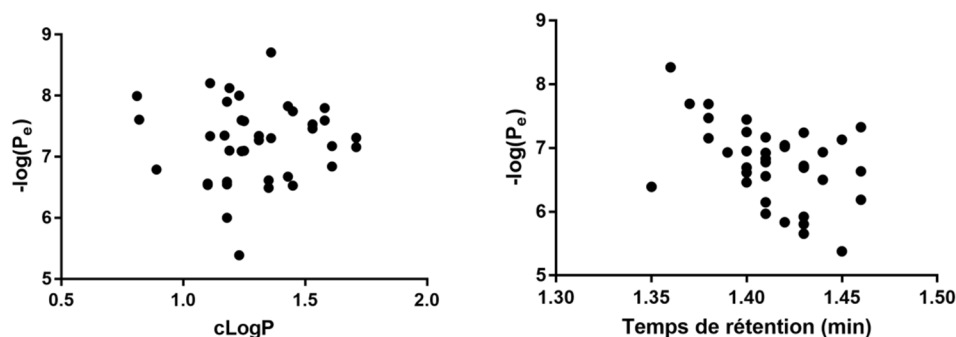


Figure 46 : Comparaison entre perméabilité en PAMPA et (**gauche**) cLogP ($R^2 = 0.006$) (**droite**) temps de rétention ($R^2 = 0.2$).

III.1.3. Deux hypothèses concernant les peptoïdes

Les résultats obtenus en PAMPA soulèvent la question suivante : pourquoi la substitution de la leucine par son analogue peptoïdique apporte-t-il un effet aussi marqué sur la perméabilité? Deux hypothèses (Figure 47) ont été formulées :

- A. La substitution de leucine par son analogue peptoïdique est davantage favorable que pour les résidus Ala et Phe.
- B. La position au sein du macrocycle de la substitution peptoïdique est le facteur le plus important.

La première hypothèse est difficile à justifier : la chaîne latérale de la leucine a à la fois une lipophilicité et un volume qui sont intermédiaires à l'alanine et à la phénylalanine.²⁴³ La seconde hypothèse pourrait se justifier de différentes façons : un lien amide flexible à cette position pourrait permettre d'atteindre des conformations particulièrement stabilisantes en fonction du milieu (*e.g.* ponts H intramoléculaires, surface polaire élevée ou basse) ou alors il est possible que ce donneur de pont H ait simplement un effet négatif sur la perméabilité. Ces deux hypothèses pourraient être évaluées par des composés ayant les mêmes acides aminés dans des positions différentes. La substitution peptoïdique du résidu opposé au chaînon donne-t-elle toujours une perméabilité accrue ?

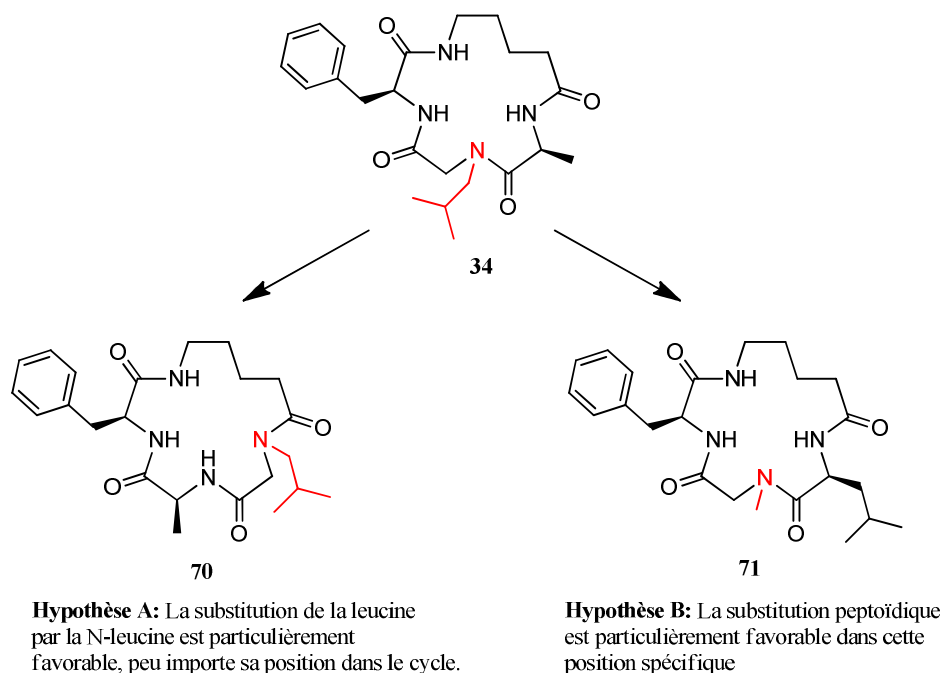


Figure 47 : Deux hypothèses pour expliquer les meilleures perméabilités observées avec Nleu.

Ces deux composés (**70** (HypA) et **71** (HypB)) ont été synthétisés et testés en PAMPA (Figure 48). Le composé le plus perméant est **71**, ce qui soutient l'hypothèse B selon laquelle la position du peptoïde dans le cycle a un effet plus important que la nature de l'acide aminé remplacé. De plus, ce composé présente une perméabilité se situant entre Nleu-Ø et Nleu-2R (voir Figure 43) et donc comparable à la série portant le peptoïde de la leucine, alors que **70** apparaîtrait en bleu.

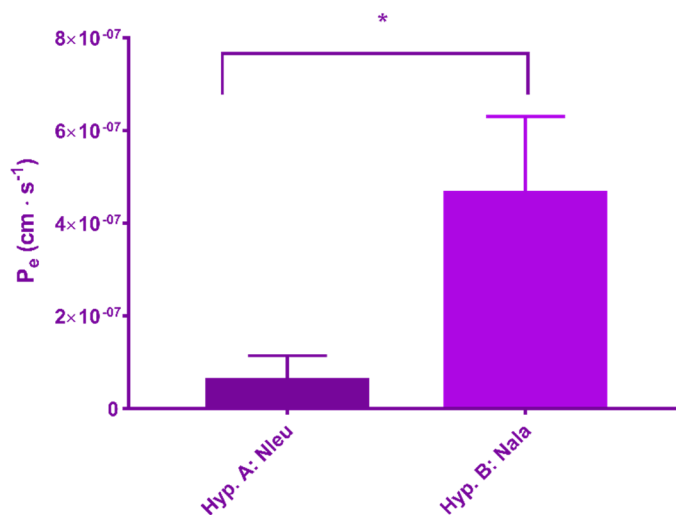


Figure 48 : Essai PAMPA des composés **70** (HypA) et **71** (HypB)

III.2 Caco-2

Les essais de perméabilité Caco-2 ont été réalisés à Montréal par Rabeb Mouna Derbali, assistante de recherche du Pr. Grégoire Leclair, et analysés à l'IPS de façon similaire à PAMPA, soit par UPLC/MS et méthode *single ion mode*.

L'essai a été fait dans les deux directions (A→B et B→A) à pH 7.4. Dans le cas du A→B, la faible étendue des résultats et l'incertitude importante sur les mesures rend l'analyse difficile (Figure 49). En effet, la différence entre les deux composés extrêmes était non significative ($P > 0.05$). Il a toutefois été possible d'observer une tendance similaire à celle en PAMPA où les composés comportant une N-leucine présentaient globalement des perméabilités élevées (Figure 50). De plus, les composés Nleu-5R et Nleu-5S ont montré des perméabilités opposées, comme en PAMPA. Certains composés ont présenté des résultats inattendus. C'est par exemple le cas de Nala-2R qui est ressorti comme le composé le plus perméant alors qu'il se situait dans la moyenne en PAMPA.

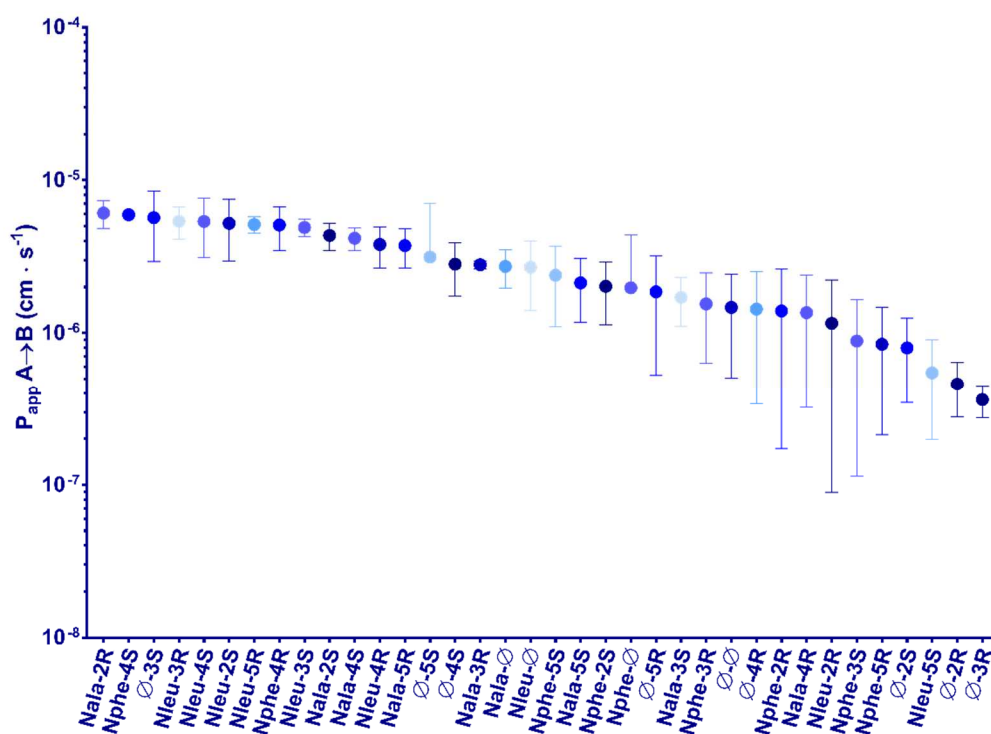


Figure 49 : Perméabilité apparente en cellules Caco-2 (A→B), en ordre décroissant.

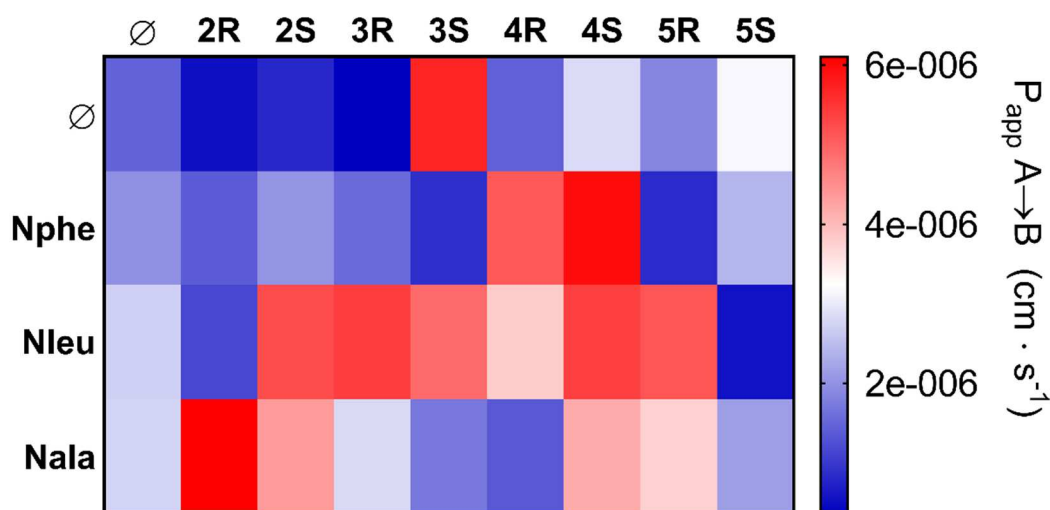


Figure 50 : Heat map Caco-2 (A→B) : La teinte vers le rouge signifie une perméabilité plus élevée. Les valeurs moyennes pour chacun des composés ont été utilisées.

L'essai Caco-2 a également été réalisé en B→A (Figure 51). Le but principal de cette expérience est de voir l'effet du transport actif, incluant l'efflux. Ce dernier a été calculé en divisant la moyenne des perméabilités A→B par la moyenne B→A. Les résultats obtenus ont montré des efflux généralement élevés où les composés ne comportant aucune substitution peptidique présentent des efflux particulièrement élevés. Considérant le rôle protecteur que joue la Pgp contre les substances exogènes, on aurait pu s'attendre à obtenir un résultat inverse, où les molécules ressemblant davantage aux acides aminés sont mieux acceptées. Une autre observation intéressante est que malgré ces efflux importants, des perméabilités A→B relativement élevées ont pu être obtenues. En Caco-2, comme en PAMPA, on définit généralement une haute perméabilité par $P_{app} > 1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$.^{48,63} Six composés se situent au-dessus cette valeur en PAMPA (Tableau 8) et 30 en Caco-2 (Tableau 9).

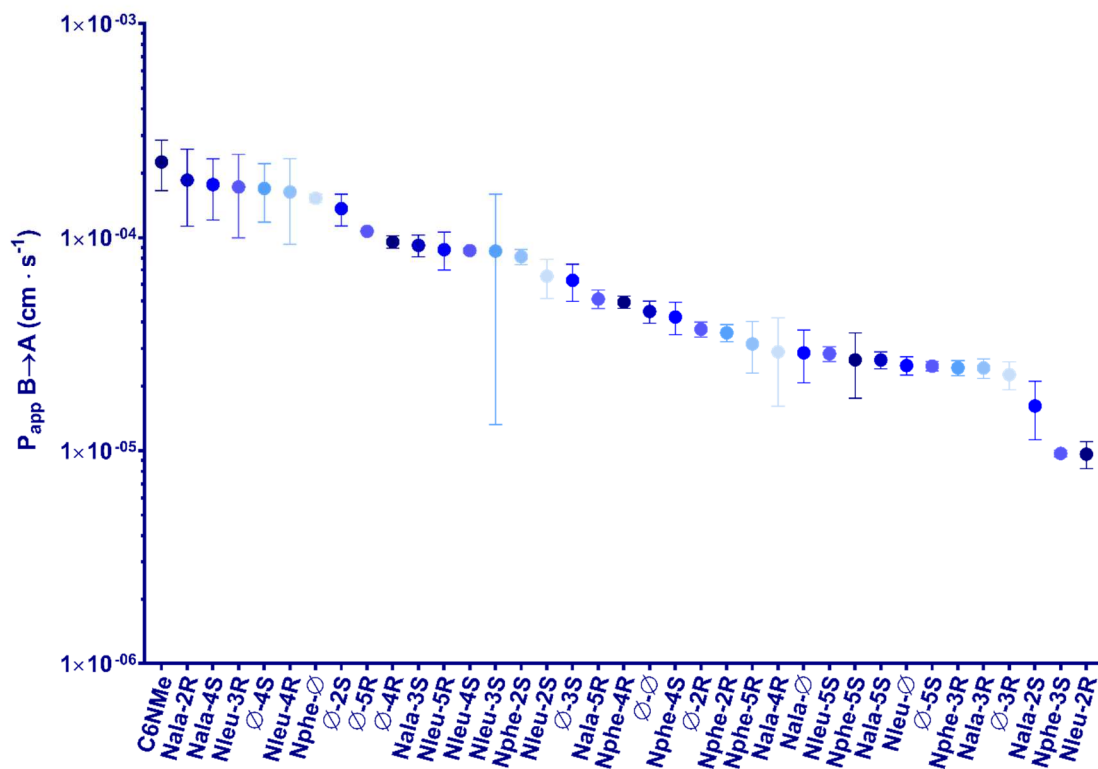


Figure 51 : Perméabilité apparente en cellules Caco-2 (B→A), en ordre décroissant.

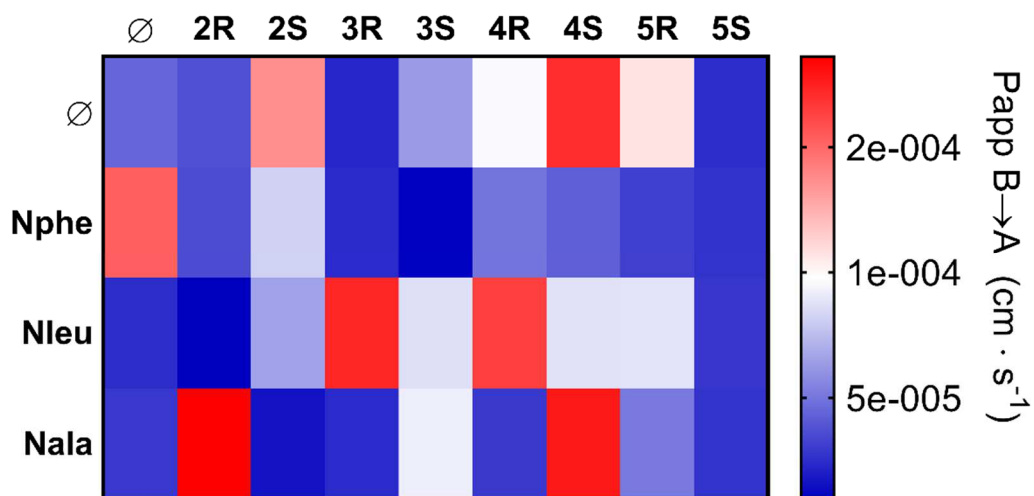


Figure 52 : Heat map Caco-2 (B→A) : La teinte vers le rouge signifie une perméabilité plus élevée. Les valeurs moyennes pour chacun des composés ont été utilisées.

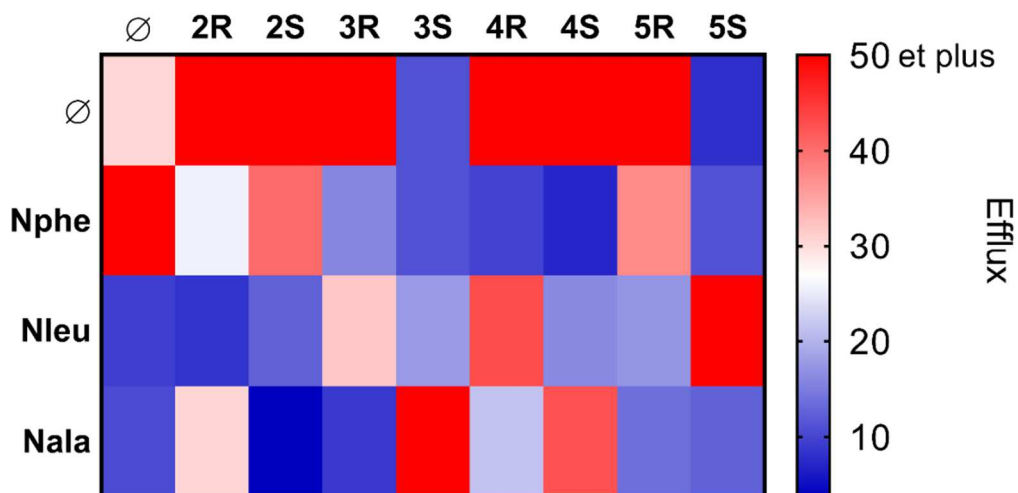


Figure 53 : Heat map de l'efflux Caco-2 mesuré par le ratio BA/AB : La teinte vers le rouge signifie un efflux plus élevé, avec une valeur limite posée à 50 pour mieux voir les valeurs plus faibles. Les moyennes ont été utilisées.

Tableau 9

Composé	MW	cLogP ²⁴²	tPSA ²⁴² (Å ²)	P _{app} AB (x10 ⁻⁶ cm/s)	P _{app} BA (x10 ⁻⁶ cm/s)	Efflux	BM _{AB} [‡] (%)	BM _{BA} (%)
Atenolol	266	0.22 ⁴³	85	1.1	1.8	1.6	121	127
Propranolol	259	3.48 ⁴³	41	17.3	23.4	1.4	87	119
Lopéramide	477	3.90 ⁴³	44	9.2	45.2	4.9	75	99
Ø-2R	445	1.71	116	0.47 ± 0.18	38.7 ± 3.0	82 ± 37	118	130
Ø-2S	445	1.71	116	0.80 ± 0.45	140 ± 20	170 ± 100	106	130
Ø-3R	445	1.45	116	0.362 ± 0.085	22.7 ± 3.4	63 ± 21	72	131
Ø-3S	445	1.45	116	5.7 ± 2.8	63 ± 13	11.0 ± 6.2	144	122
Ø-4R	445	1.53	116	1.4 ± 1.1	95.8 ± 6.5	67 ± 45	98	123
Ø-4S	445	1.53	116	2.8 ± 1.1	170 ± 52	60 ± 34	106	128
Ø-5R	445	1.58	116	1.9 ± 1.3 [†]	107.21 ± 0.53	58 ± 29	108	110
Ø-5S	445	1.58	116	3.1 ± 3.9	24.9 ± 1.3	7.9 ± 8.4	125	103
Nala-2R	445	1.36	108	6.10 ± 1.27	186 ± 73	31 ± 15	97	105
Nala-2S	445	1.36	108	4.36 ± 0.88	16.2 ± 4.9	3.7 ± 1.5	98	95
Nala-3R	445	1.11	108	2.80 ± 0.17	24.4 ± 2.5	8.7 ± 1.2	98	85
Nala-3S	445	1.11	108	1.71 ± 0.61	92 ± 11	54 ± 21	120	91
Nala-4R	445	1.19	108	1.4 ± 1.0	29 ± 13	21 ± 21	130	99
Nala-4S	445	1.19	108	4.18 ± 0.70	177 ± 56	53 ± 17	126	99
Nala-5R	445	1.24	108	3.7 ± 1.1	51.2 ± 5.1	13.7 ± 4.3	131	102
Nala-5S	445	1.24	108	2.13 ± 0.96	26.6 ± 2.4	12.5 ± 5.5	121	94
Nala-Ø	431	0.82	108	2.73 ± 0.77	28.7 ± 8.0	10.5 ± 4.8	77	137
Nleu-2R	445	1.35	108	1.2 ± 1.1	9.6 ± 1.4	8.3 ± 7.3	28	25
Nleu-2S	445	1.35	108	5.2 ± 2.3	65 ± 14	12.5 ± 6.6	109	89
Nleu-3R	445	1.1	108	5.4 ± 1.3	173 ± 73	32 ± 17	128	118
Nleu-3S	445	1.1	108	4.91 ± 0.65	87 ± 73	17 ± 14	116	95
Nleu-4R	445	1.18	108	3.8 ± 1.1	160 ± 70	43 ± 26	126	123
Nleu-4S	445	1.18	108	5.4 ± 2.3	87.1 ± 2.3	16.2 ± 5.9	117	95
Nleu-5R	445	1.23	108	5.13 ± 0.62	88 ± 18 [†]	17.2 ± 4.2	126	138

Nleu-5S	445	1.23	108	0.55 ± 0.35	28.4 ± 2.3	52 ± 30	97	87
Nleu-Ø	431	0.81	108	2.7 ± 1.3	25.0 ± 2.5	9.3 ± 4.4	66	126
Ø-Ø	431	1.17	116	1.47 ± 0.96	44.8 ± 5.3	30 ± 19	88	130
Nphe-2R	445	1.43	108	1.4 ± 1.2	35.6 ± 3.3	25 ± 20	105	81
Nphe-2S	445	1.43	108	2.02 ± 0.89	81.6 ± 6.7	40 ± 17	129	91
Nphe-3R	445	1.18	108	1.55 ± 0.92	24.5 ± 2.0	15.8 ± 8.7	135	119
Nphe-3S	445	1.18	108	0.89 ± 0.77	9.73 ± 0.35	11.0 ± 8.1	31	27
Nphe-4R	445	1.25	108	5.1 ± 1.6	49.5 ± 3.3	9.7 ± 3.1	115	80
Nphe-4S	445	1.25	108	5.95 ± 0.12	42.2 ± 7.2	7.1 ± 1.1	116	99
Nphe-5R	445	1.31	108	0.84 ± 0.63	31.6 ± 8.5	37 ± 31	102	78
Nphe-5S	445	1.31	108	2.4 ± 1.3	26.6 ± 9.0	11.1 ± 8.0	157	114
Nphe-Ø	431	0.89	108	1.9 ± 2.4	153.1 ± 6.9	77 ± 80	112	119

†: En duplicata

‡: BM : Balance massique

On remarque aussi plusieurs valeurs de balance massique supérieures à 100% et quelques-unes se situant loin sous la moyenne. Les valeurs inférieures à 100% pourraient provenir d'un métabolisme cellulaire, mais il est toutefois difficile d'expliquer les valeurs supérieures à 100%. De telles balances massiques témoignent vraisemblablement d'un problème expérimental ou analytique. Malgré tout, plusieurs composés présentent des balances massiques normales et aucune corrélation avec la perméabilité n'a été observée. Une comparaison des valeurs absolues entre PAMPA et Caco-2 est rarement faite, mais une comparaison des valeurs relatives est possible (Figure 54 et 55). La corrélation entre la perméabilité Caco-2 et PAMPA est faible. Cependant, les six composés les plus perméants en PAMPA ont tous des perméabilités Caco-2 plus élevées que la moyenne, notamment Nleu-5R qui montre la perméabilité la plus élevée dans les deux essais. Il a également été remarqué que Nleu-5S – qui ne diffère que par la stéréochimie du méthyle du chaînon – présentait des perméabilités inférieures à la moyenne dans les deux essais (Figure 56).

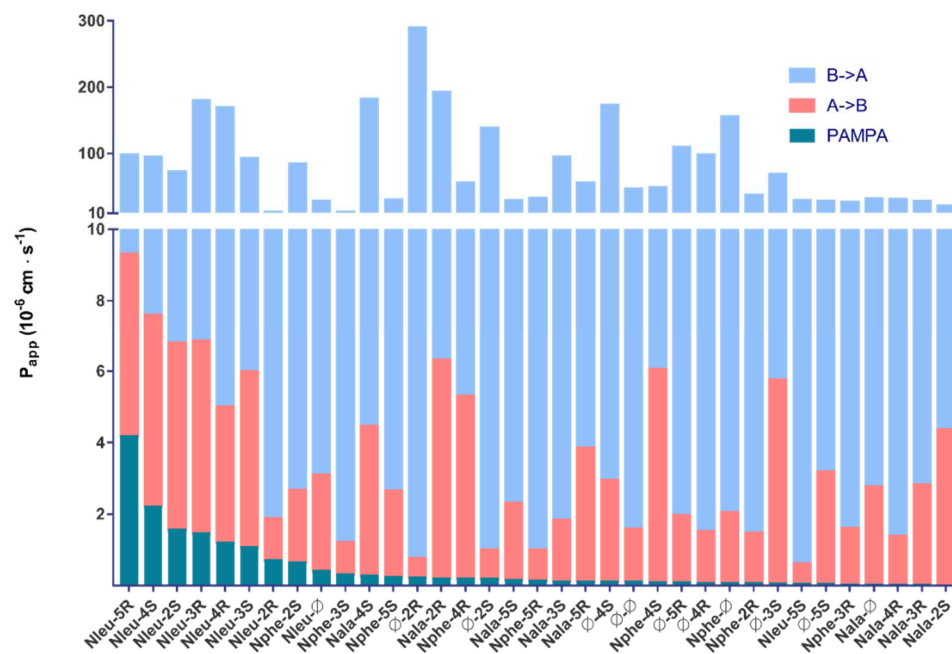


Figure 54 : Comparaison des perméabilités PAMPA et Caco-2.

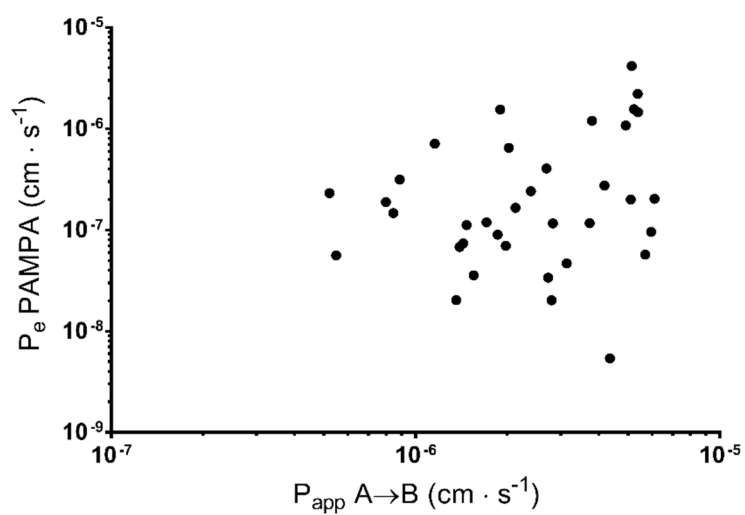


Figure 55 : Absence de forte corrélation entre les perméabilités en Caco-2 et en PAMPA.

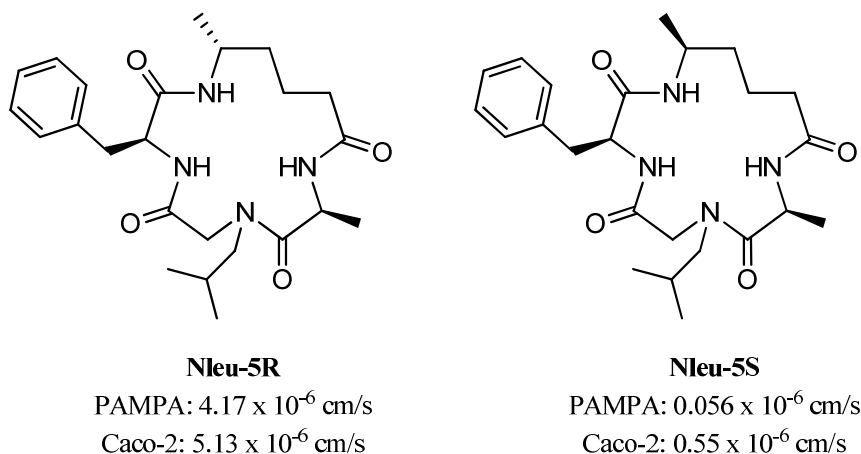


Figure 56 : Comparaison de Nleu-5R et Nleu-5S

III.3 Analyse conformationnelle RMN

Afin de trouver un rationnel aux différences de perméabilité observées, certains macrocycles ont été analysés en détail par spectroscopie RMN. Comme la différence la plus importante observée concerne la position de la substitution pour un peptotide, il a été jugé préférable d'étudier d'abord cet effet au cœur d'un même chaînon. La série comportant le méthyle en 2S (Ø-2S, Nala-2S, Nleu-2S et Nphe-2S) a été retenue (Figure 57), puisqu'elle comporte le plus grand nombre d'écarts significatifs en PAMPA.

Au cours d'un test de perméabilité, le composé se retrouve dans deux types de milieux : hydrophile et hydrophobe (*i.e.* la membrane). Pour mimer ces deux milieux, les différentes expériences ont été réalisées dans deux solvants : d^6 -DMSO et $CDCl_3$ respectivement, à une concentration de 5 mmol/L.^{171,244,245} Dans un premier temps, l'assignation des signaux a été faite en utilisant les expériences 1H , TOCSY, COSY et HSQC. Suite à ceci, les expériences ROESY ont permis de confirmer la structure *trans* de tous les peptoides, à l'exception de Nala-2S ($CDCl_3$) et Ø-2S ($CDCl_3$) qui n'ont pu être confirmés, faute d'un signal suffisamment intense. Finalement, l'acquisition de plusieurs spectres 1H à différentes températures a permis de déterminer si les protons d'amide participent à un pont H intramoléculaire.^{161,244,246,247}

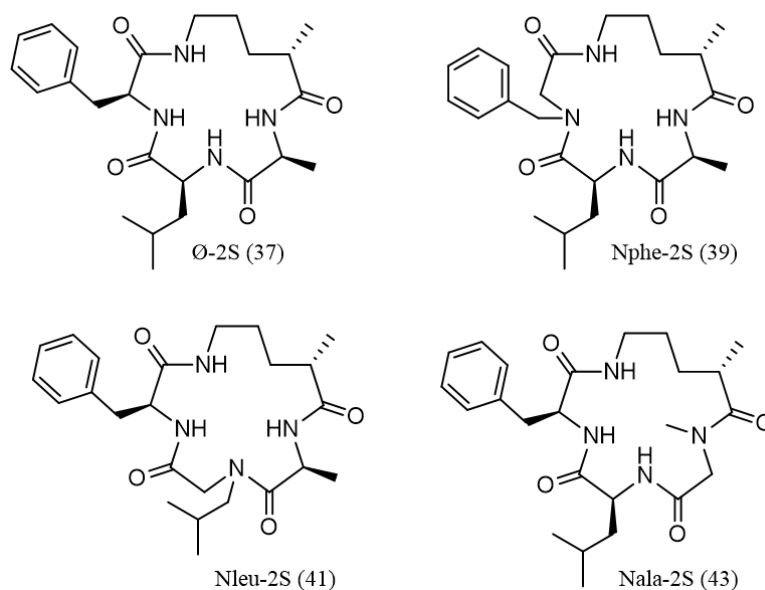
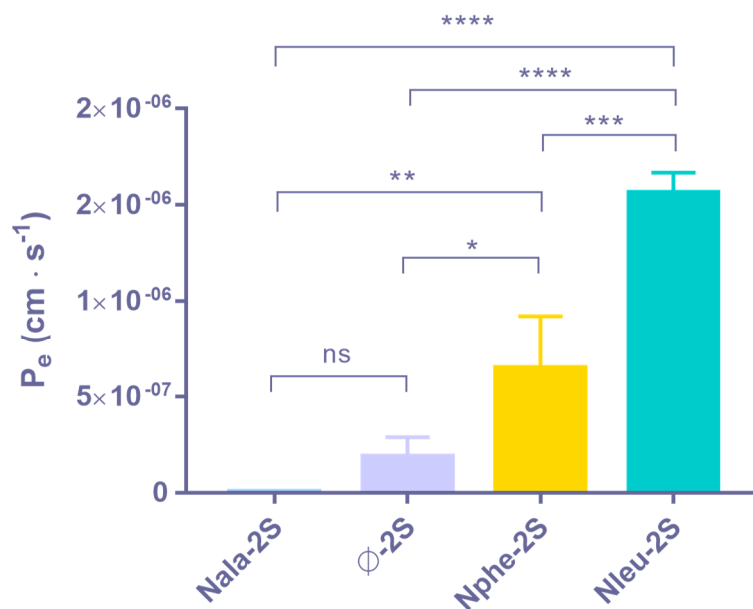


Figure 57 : Série 2S

Le Tableau 10 et la Figure 58 permettent d'identifier visuellement les amides dont l'hydrogène est impliqué dans un pont H intramoléculaire (en vert) ou non (en rouge). La valeur de -4.6 ppb/K a été utilisée comme critère.²⁴⁶ On peut donc noter que certains amides se situent très près de cette valeur (voir Figure 59 pour un exemple de détermination des valeurs de ppb/K). De plus, il est important de souligner que la proximité d'un noyau aromatique peut avoir un effet sur cette valeur.²⁴⁶ Le cône d'anisotropie d'un groupement aromatique peut entraîner des ppb/K plus élevés et parfois même supérieurs à zéro, comme

c'est le cas pour Nala-2S dans le CDCl_3 . Néanmoins, on peut affirmer que les amides dont la valeur est inférieure à -4.6 ppb/K sont exposés au solvant. En théorie, un milieu hydrophobe tel que le chloroforme devrait avoir des donneurs de ponts H moins exposés au solvant qu'un milieu hydrophile tel le DMSO. C'est effectivement ce qui est observé : en faisant la somme des ppb/K pour chacun des solvants, on obtient -40.82 pour le CDCl_3 et -56.05 pour le d_6 -DMSO. Bien que le nombre de ponts H intramoléculaires observés ne semble pas être directement relié avec la perméabilité passive P_e , un facteur qui corrèle bien est la somme des ppb/K pour le DMSO ($R^2 = 0.74$). Autrement dit, plus les NH d'amides sont exposés dans le milieu hydrophile, plus leur perméabilité est élevée.

Tableau 10

	<u>Nala-2S</u>		<u>Ø-2S</u>		<u>Nphe-2S</u>		<u>Nleu-2S</u>	
	CDCl_3	d_6 -DMSO	CDCl_3	d_6 -DMSO	CDCl_3	d_6 -DMSO	CDCl_3	d_6 -DMSO
H_N (Phe)	0.9	-4.4	-0.9	-4.0			-0.1	-8.8
H_N (Leu)	-2.4*	-4.8	-3.2	-1.6	-11.3	-7.7		
H_N (Ala)			-4.6*	-3.8	-3.8	-5.8	-3.7	-6.2
H_N (Chaînon)	-2.4*	-0.82	-4.6*	-3.8	-2.2	-2.6	-2.7	-1.7
Σ	-3.8	-10.1	-13.3	-13.2	-17.3	-16.0	-6.5	-16.8
$\Sigma \text{DMSO} - \text{CDCl}_3 $	9.4		6.2		6.0		12.2	
P_e	5.40E-09		1.90E-07		6.48E-07		1.56E-06	

*Signaux indistinguables

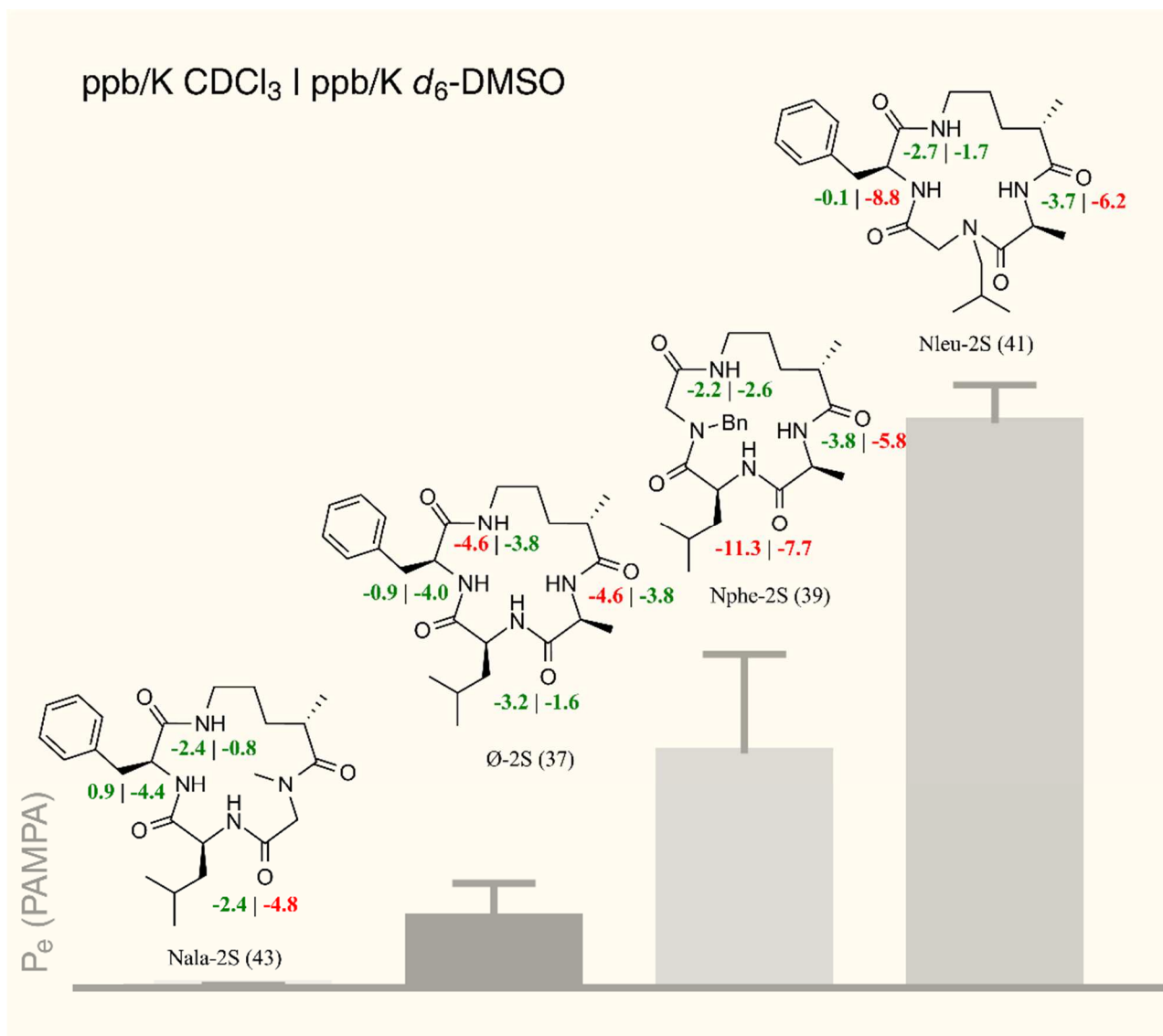


Figure 58 : Amides exposés au solvant (en rouge)

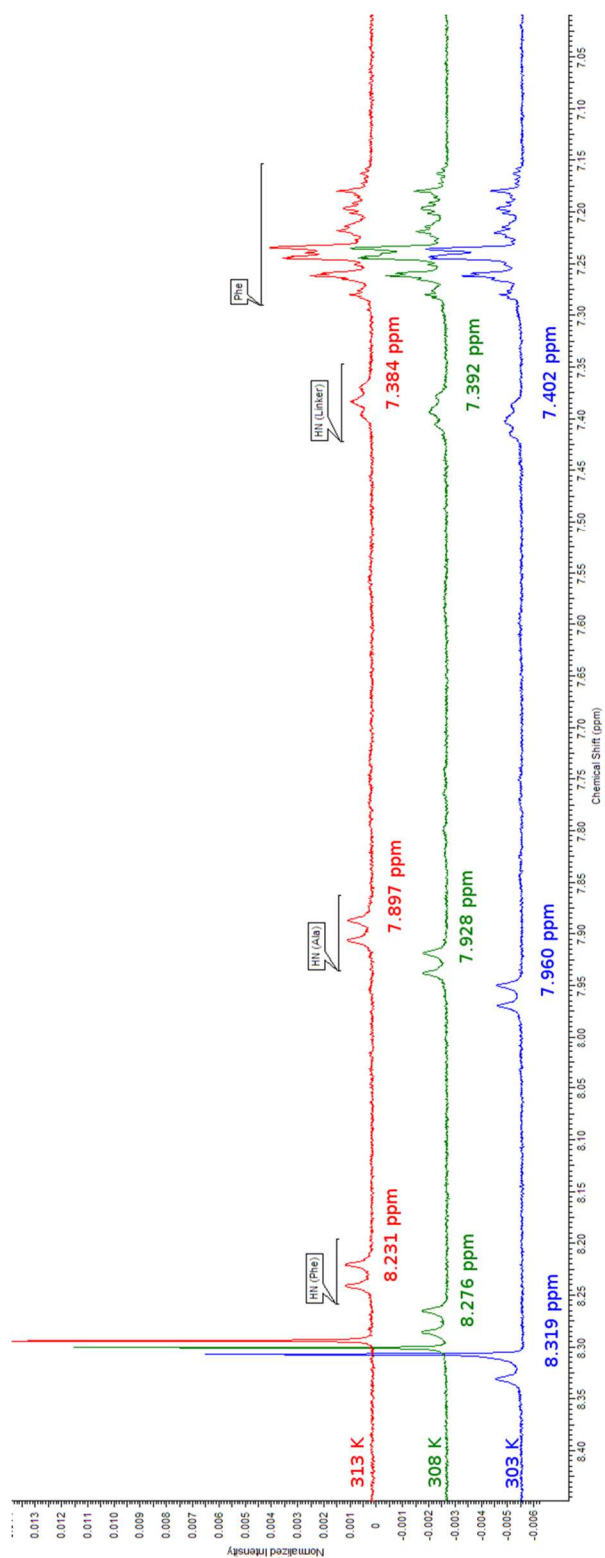
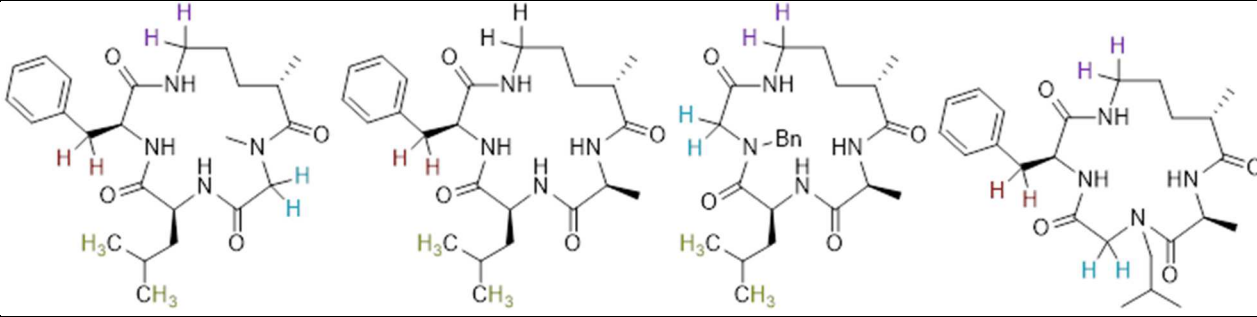


Figure 59 : Exemple de détermination du ppb/K d'amides.

Tel que vu précédemment, les perméabilités plus élevées des composés comportant le peptoïde de la leucine sont vraisemblablement liées à la position de ce peptoïde dans le cycle, et non à la nature même du peptoïde de la leucine (voir Section III.1.3). Cette observation mène à son tour à différentes hypothèses. L'une d'entre elles étant que l'amide de cette position ne puisse pas participer à des ponts H intramoléculaires, ce qui entraînerait un coût énergétique élevé lors du passage en milieu hydrophile. En remplaçant le peptide de cette position par son analogue peptoïdique, le donneur de pont H problématique disparaît. Cette hypothèse ne semble cependant pas en accord avec les données présentées plus haut (Figure 58). Des trois composés portant un amide secondaire à cette position, seul Nphe-2S le présente au solvant dans un milieu lipophile (CDCl_3). Une autre possibilité est que la nature plus flexible du peptoïde – ou encore son absence de chiralité – lui permette d'atteindre des conformations inaccessibles avec le résidu peptidique et que ces conformations soient plus favorables à la perméabilité que celles apportées par une substitution peptoïdique aux autres positions. On observe aussi que l'amide du chaînon est toujours impliqué dans un pont H intramoléculaire (la seule exception se situe exactement sur la valeur limite de -4.6 ppb/K). La nature flexible du chaînon pourrait favoriser le rapprochement entre l'amine et le carbonyle du chaînon ou de l'alanine.

Un autre paramètre étudié à partir du spectre ^1H assigné est la différence de déplacement de certains groupements diastérotopiques (protons ou méthyles). Dans le cas des protons géminaux, trois conditions doivent être présentes pour qu'une différence soit observée²⁴⁸ : 1) l'absence d'une symétrie reliant les deux protons géminaux, mais non les protons auxquels ils sont couplés, 2) le mouvement moléculaire ne doit pas permettre aux deux protons géminaux d'occuper le même environnement pour des durées similaires et 3) il doit y avoir un gradient de champ entre les deux protons. Le point 2 nous intéresse particulièrement, car il est relié au concept de rigidité moléculaire. Les macrocycles sont contraints par définition, mais à différents degrés en fonction de la taille du cycle et des liens qui le composent. Dans la série 2S étudiée ici, la nature des liens demeure identique, seule la position du peptoïde change. Le Tableau 11 et la Figure 60 ci-dessous rapportent les différences de déplacement observées pour quatre paires de protons.

Tableau 11

								
	Nala-2S		Ø-2S		Nphe-2S		Nleu-2S	
	CDCl ₃	DMSO	CDCl ₃	DMSO	CDCl ₃	DMSO	CDCl ₃	DMSO
H _β (Phe)	0.33	0.42	0.48	0.22			0	0.4
H _δ (Chaînon)	0.47	0.46	0.67	0.41	0.45	0.19	0.75	0
H _δ (Leu)	0.06	0.08	0.05	0.03	0.17	0.25		
H _α (peptide)	0.51	0.68			1.36	0.73	1.52	0.89
Σ DMSO - CDCl ₃ _{rel}	0.46		0.98		1.33		2.46	
P _e	5.40E-09		1.90E-07		6.48E-07		1.56E-06	

Dans le tableau, les valeurs en rouge signifient de grandes différences de déplacement, donc un environnement relativement rigide. L'échelle de couleur est différente pour chacune des paires rapportées (*i.e.* chacune des rangées), car tel que vu précédemment, le gradient de champ entre les deux protons joue également un rôle dans le niveau de séparation. On ne peut donc pas comparer directement deux rangées entre elles. Plusieurs de ces mesures corrèlent fortement avec la perméabilité (Tableau 12), incluant à la fois des tendances dans un seul solvant (entrées 1-4), une tendance basée sur les différences entre deux solvants (entrée 5) et une tendance globale basée sur la somme des différences relatives des quatre paramètres (entrée 6). Cette dernière mesure est calculée comme suit : on détermine d'abord l'écart le plus important au sein d'une même rangée, par exemple le paramètre H_β (Phe) a un écart maximal de 0.48 (0.48 – 0). Puis, pour un composé donné, l'écart entre les deux solvants est divisé par l'écart maximal. Par exemple pour Nala-2S, on obtient (0.42-0.33)/0.48 ≈ 0.19. Pour un composé donné, la somme de ces différences relatives (trois ou quatre selon le cas) donne la mesure dénotée Σ |DMSO - CDCl₃|_{rel}. Plus cette valeur est élevée, plus la molécule présente de grandes différences d'un solvant à l'autre.

Tableau 12

Entrée	Paramètre	Solvant	R ²	Sens pour P _e ↑
1	H _β (Phe)	CDCl ₃	0.83	Flexible
2	H ₅ (Chaînon)	d ₆ -DMSO	0.97	Flexible
3	H _δ (Leu)	CDCl ₃	0.90	Rigide
4	H _α (peptoïde)	d ₆ -DMSO	0.96	Rigide
5	H ₅ (Chaînon)	CDCl ₃ - d ₆ -DMSO	0.96	Grande différence
6	Σ DMSO - CDCl ₃ _{rel}	-	0.99	Grandes différences

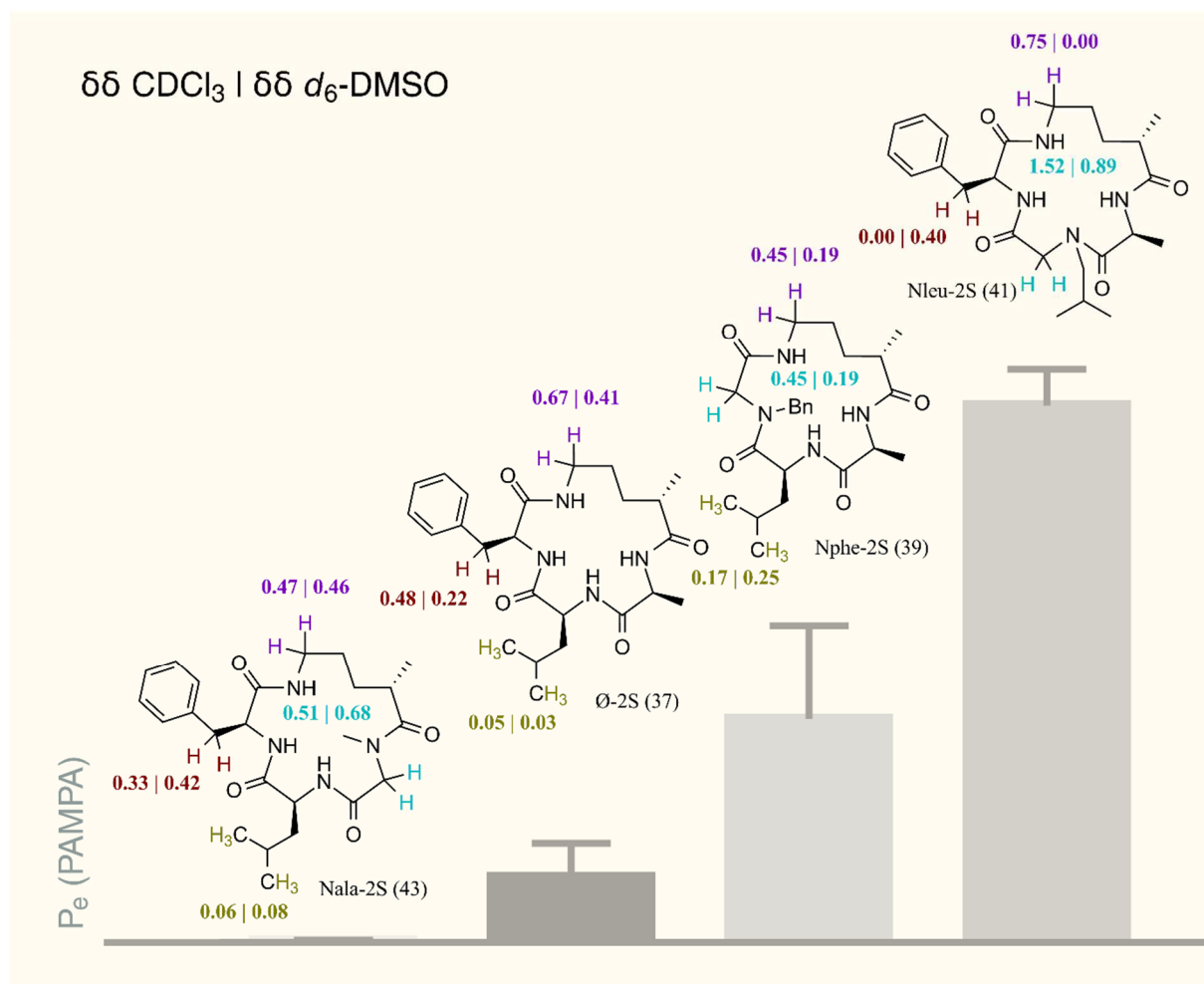


Figure 60 : Comparaison entre différences de déplacement et perméabilité

Les corrélations affichées au Tableau 12 ne sont basées que sur trois ou quatre points, mais il est intéressant de remarquer que les R^2 les plus élevés correspondent aux tendances sur quatre points (entrées 2, 5 et 6). La valeur globale $\sum |\text{DMSO} - \text{CDCl}_3|_{\text{rel}}$ est particulièrement intéressante, car elle suggère que plus le changement conformationnel entre les deux milieux est grand, plus la perméabilité passive est élevée. Bien que toutes ces mesures de différences de déplacement puissent être associées à la rigidité moléculaire, il faut garder en tête que ces différences dépendent également de l'environnement chimique des groupements diastérotopiques (point 3 ci-haut), ce qui rend la comparaison entre différentes molécules difficile, aussi similaires soient-elles. Cependant, la comparaison d'une même molécule entre deux solvants réduit cette ambiguïté : tout changement – qu'il soit lié à une différence de rigidité ou à une différence d'environnement – témoigne d'un changement conformationnel. Le même raisonnement peut s'appliquer à la mesure de ppb/K vue précédemment : bien que ces données corréleront moins bien que les différences de déplacement, il demeure que la plus grande différence observée est aussi associée au composé le plus perméant (Nleu-2S).

Les composés **70** et **71** (HypA et HypB) ont également été caractérisés par RMN 2D dans le d_6 -DMSO (Tableau 13), ce qui permet de retrouver deux des six paramètres identifiés plus haut présentant une bonne corrélation : H_5 (Chaînon) et H_α (peptoïde) dans le DMSO. Dans les deux cas, on aurait pu prédire correctement lequel de ces deux composés allait être le plus perméant.

Tableau 13

	<u>HypA</u>	<u>HypB</u>
	$\delta\delta_{\text{DMSO}}$ (ppm)	$\delta\delta_{\text{DMSO}}$ (ppm)
H_β (Phe)	0.32	0.40
H_5 (Chaînon)	0.26	0.00
H_δ (Leu)	0.06	0.03
H_α (peptoïde)	0.54	1.09
P_e	6.12E-08	4.65E-07

Les différentes expériences RMN présentées ci-haut ont permis de tirer les conclusions suivantes:

1. L'importance de cette position ne semble pas être reliée avec un donneur de pont H exposé au solvant que l'on aurait éliminé par la substitution peptoïdique.
2. L'amide du chaînon n'est presque jamais exposé au solvant, que ce soit le CDCl_3 ou le DMSO.
3. Plus les amides sont exposés dans le solvant hydrophile, meilleure est la perméabilité.
4. Une bonne corrélation est observée entre la perméabilité et la différence de déplacement des protons H_5 du chaînon, suggérant que le chaînon des composés les plus perméants est plus flexible.
5. Les différences conformationnelles entre un milieu hydrophile et un milieu hydrophobe sont plus importantes pour les composés perméants.

Il avait été déterminé précédemment que la position du peptoïde jouait un rôle important. Le point 1 vient compléter cette observation. L'effet du peptoïde est donc lié à sa géométrie et non à un amide exposé qu'il aurait masqué.

Les points 2 et 4 sont reliés au chaînon: l'amide n'est pas ou peu exposé au solvant, ce qui laisse suggérer un pont H intramoléculaire favorable. Cependant, plus la chaîne carbonée est flexible, meilleure est la perméabilité. Il est possible que cet amide puisse participer à plus d'un pont H : il est bien placé pour interagir à la fois avec son propre carbonyle et avec celui de l'alanine.

Les points 3 et 5 se complètent : pour un composé perméant, on recherche d'une part de fortes interactions avec le milieu hydrophile et d'autre part une grande différence de conformation entre les deux milieux. Autrement dit, un composé ayant une bonne solubilité dans les deux milieux. Il pourrait être intéressant à cet égard de comparer la solubilité de ces composés dans l'eau et dans la membrane.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce projet visait à synthétiser et à évaluer la relation structure-perméabilité d'un ensemble de macrocycles semi-peptidiques. Deux modifications conformationnelles ont été étudiées conjointement : la substitution d'un acide aminé par son analogue peptoïdique et les différentes positions d'un méthyle sur un chaînon aliphatique. La première modification permettait de changer la géométrie du squelette peptidique alors que la deuxième introduisait un point rigide au sein du chaînon.

La perméabilité passive a été étudiée par un essai PAMPA et la perméabilité effective par un essai sur cellules Caco-2. L'analyse de ces résultats a conduit à limiter l'interprétation de l'expérience de Caco-2, qui à ce stade n'était pas suffisamment reproductible. De plus, l'essai PAMPA présentait l'avantage de décrire uniquement la perméabilité passive, qui était le paramètre le plus directement relié à l'étude de la relation structure-perméabilité.

Les résultats obtenus sont dispersés sur une grande plage de valeurs et montrent que les deux modifications apportées peuvent avoir un effet tant positif que négatif sur la perméabilité. Il a cependant été observé que la substitution du peptoïde de la leucine apportait un effet positif important, élevant la majorité de ces macrocycles dans la catégorie des composés non limités par leur perméabilité. Deux hypothèses ont été formulées pour expliquer cet effet marqué et on a pu déterminer que c'est la position de cette substitution au sein du macrocycle qui est importante. Concernant l'effet de la position du méthyle sur le chaînon, aucune tendance globale n'a été observée. On a cependant pu remarquer que certains couples d'épimères présentaient des perméabilités significativement différentes, sans toutefois être en mesure d'en expliquer la cause. Des études basées sur la dynamique moléculaire sont prévues pour ce faire.

Une étude conformationnelle basée sur différentes expériences RMN a permis d'approfondir notre compréhension de la relation structure-perméabilité, notamment en analysant les ponts H intramoléculaires et les différences de conformations entre un milieu hydrophile et hydrophobe. Comme autre résultante de ce projet, l'essai PAMPA a pu être développé à l'IPS et l'essai Caco-2 est également en cours de développement. La librairie présentée dans ce mémoire sera aussi suppléée de nouveaux composés présentant de nouveaux chaînons et de nouveaux isostères d'amide.

RÉFÉRENCES ET NOTES

- (1) Parker, S. E.; Davey, P. G. *Pharmacoeconomics* **1992**, *1* (2), 103–115.
- (2) Kwan, K. C. *Drug Metab. Dispos.* **1997**, *25* (12), 1329–1336.
- (3) Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Rang, H. P.; Handerson, G. *Rang & Dale's Pharmacology*; 2016.
- (4) Wetsteyn, J.; De Vries, P.; Oosterhuis, B.; Van Boxtel, C. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1995**, *39* (6), 696–699.
- (5) Yu, M.; Pei, K.; Moran, S.; Edwards, K. D.; Domingo, S.; Steinemann, S.; Ghows, M.; Takiguchi, S.; Tan, A.; Lurie, F.; Takanishi, D. *Shock* **2011**, *35* (3), 220–228.
- (6) Chan, O. H.; Stewart, B. H. *Drug Discov. Today* **1996**, *1* (11), 461–473.
- (7) Martinez, M.; Amidon, G. J. *Clin. Pharmacol.* **2002**, *42*, 620–643.
- (8) Wilson, C. G.; Crowley, P. J. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53* (9), 1689–1699.
- (9) Helander, H. F.; Fandriks, L. *Scand J Gastroenterol* **2014**, *49* (6), 681–689.
- (10) Rodriguez-boulan, E.; Nelson, W. J. *Science (80-.)*. **1989**, *245* (1983), 718–725.
- (11) Sousa, T.; Paterson, R.; Moore, V.; Carlsson, A.; Abrahamsson, B.; Basit, A. W. *Int. J. Pharm.* **2008**, *363* (1–2), 1–25.
- (12) Pang, K. S. *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31* (12), 1507–1519.
- (13) Adrian, C.; Brodie, B. **1957**, 540–545.
- (14) Sugano, K.; Kansy, M.; Artursson, P.; Avdeef, A.; Bendels, S.; Di, L.; Ecker, G. F.; Faller, B.; Fischer, H.; Gerebtzoff, G.; Lennernaes, H.; Senner, F. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9* (8), 597–614.
- (15) Kell, D. B.; Oliver, S. G. *Front. Pharmacol.* **2014**, *5* (October), 231.
- (16) Zolk, O.; Fromm, M. F. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2011**, *89* (6), 798–805.
- (17) Fardel, O.; Lecureur, V.; Guillouzo, A. *Gen. Pharmacol.* **1996**, *27* (8), 1283–1291.
- (18) Consortium, I. T.; Giacomini, K.; Huang, S.-M.; Tweedie, D.; Benet, L.; Brouwer, K.; Chu, X.; Dahlin, A.; Evers, R.; Fischer, V.; Hillgren, K.; Hoffmaster, K.; Ishikawa, T.; Keppler, D.; Kim, R.; Lee, C.; Niemi, M.; Polli, J.; Sugiyama, Y.; Swaan, P.; Ware, J.; Wright, S.; Yee, S.; Zamek-Gliszczyński, M.; Zhang, L. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9* (3), 215–236.
- (19) Di, L.; Kerns, E. H.; Di, L.; Kerns, E. H. In *Drug-Like Properties*; 2016; pp 339–350.
- (20) Di, L.; Kerns, E. H.; Di, L.; Kerns, E. H. In *Drug-Like Properties*; 2016; pp 113–140.
- (21) Sun, H. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32* (11), 1239–1246.
- (22) Di, L.; Kerns, E. H.; Di, L.; Kerns, E. H. In *Drug-Like Properties*; 2016; pp 95–111.
- (23) Lin, J. H.; Chiba, M.; Baillie, T. a. *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51* (2), 135–158.
- (24) Guengerich, F. P. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14* (6), 611–650.
- (25) Meunier, B.; de Visser, S. P.; Shaik, S. *Chem. Rev. (Washington, DC, United States)* **2004**, *104* (9), 3947–3980.
- (26) Garner, R. C.; Miller, E. C.; Miller, J. A. **1972**, *32* (October), 2058–2066.
- (27) Lieber, C. S. *Gastroenterology* **1994**, *106* (4), 1085–1105.
- (28) Gonzalez, F. J. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2005**, *569* (1–2), 101–110.
- (29) Jollow, D.; Mitchell, J. R.; Zampaglione, N.; Gillette, J. R. *Pharmacology* **1974**, *11* (3), 151–169.
- (30) Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Järvinen, T.; Savolainen, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7* (3), 255–270.
- (31) Huttunen, K.; Mahonen, N.; Raunio, H.; Rautio, J. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15* (23), 2346–2365.
- (32) Ortiz de Montellano, P. R. *Future Med. Chem.* **2013**, *5* (2), 213–228.
- (33) H. Van de Waterbeemd, D. A. Smith and B. C. Jones. *J. Comput. aided Mol. Des.* **2001**, *15*, 273–

- 286.
- (34) Mitsuru, H.; Shinji, N.; Hisako, K.; Nobuyoshi, K. *Int. J. Pharm.* **1984**, 20 (1–2), 73–85.
 - (35) Hamelin, B. *Trends Pharmacol. Sci.* **1998**, 19 (January), 26–37.
 - (36) Gavhane, Y. N.; Yadav, A. V. *Saudi Pharm. J.* **2012**, 20 (4), 331–344.
 - (37) Lin, J. H.; Lu, A. Y. H. *Pharmacol. Rev.* **1997**, 49 (4), 403–449.
 - (38) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, 23 (1), 3–25.
 - (39) *Nat Rev Drug Discov* **2012**, 11 (12), 900–901.
 - (40) Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2615–2623.
 - (41) Hartsough, D. S.; Merz, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115 (15), 6529–6537.
 - (42) Palm, K.; Luthman, K.; Ungell, A. L.; Strandlund, G.; Beigi, F.; Lundahl, P.; Artursson, P. *J. Med. Chem.* **1998**, 41 (27), 5382–5392.
 - (43) Avdeef, A. *Absorption and Drug Development*; 2012.
 - (44) Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. *J. Med. Chem.* **1998**, 41 (7), 1007–1010.
 - (45) Di, L.; Kerns, E. H. In *Drug-Like Properties*; Elsevier, 2016; pp 299–306.
 - (46) Venema, K. *Impact Food Bioact. Heal. Vitro. Ex Vivo Model.* **2015**, 293–304.
 - (47) Hidalgo, I. J.; Raub, T. J.; Borchardt, R. T. *Gastroenterology* **1989**, 96 (3), 736–749.
 - (48) Artursson, P.; Palm, K.; Luthman, K. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, 64 (SUPPL.), 280–289.
 - (49) Tavelin, S.; Gråsjö, J.; Taipalensuu, J.; Ocklind, G.; Artursson, P. *Epithel. Cell Cult. Protoc.* **2002**, 188, 233–272.
 - (50) Hubatsch, I.; Ragnarsson, E. G. E.; Artursson, P. *Nat. Protoc.* **2007**, 2 (9), 2111–2119.
 - (51) Protocol, P. A. .
 - (52) Palm, K.; Luthman, K.; Ros, J.; Gråsjö, J.; Artursson, P. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, 291 (2), 435–443.
 - (53) Balimane, P. V.; Pace, E.; Chong, S.; Zhu, M.; Jemal, M.; Van Pelt, C. K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 39 (1–2), 8–16.
 - (54) Liu, T.; Chang, L. J.; Uss, A.; Chu, I.; Morrison, R. A.; Wang, L.; Prelusky, D.; Cheng, K. C.; Li, C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, 51 (5), 1069–1077.
 - (55) Avdeef, A. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2005**, 1 (2), 325–342.
 - (56) Reis, J. M.; Sinkó, B.; Serra, C. H. R. *Mini Rev. Med. Chem.* **2010**, 10 (11), 1071–1076.
 - (57) Lodish, H.; Berk, A.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Bretscher, A.; Ploegh, H.; Amon, A.; Scott, M. P.; Martin, K. *Molecular cell biology*; 2016.
 - (58) Flaten, G. E.; Dhanikula, A. B.; Luthman, K.; Brandl, M. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, 27 (1), 80–90.
 - (59) Kerns, E. H.; Di, L.; Kerns, E. H.; Di, L. In *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*; 2008; pp 287–298.
 - (60) Nielsen, P. E.; Avdeef, A. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, 22 (1), 33–41.
 - (61) Bicker, J.; Alves, G.; Fortuna, A.; Soares-Da-Silva, P.; Falcão, A. *Int. J. Pharm.* **2016**, 501 (1–2), 102–111.
 - (62) Kerns, E. H.; Di, L.; Petusky, S.; Farris, M.; Ley, R.; Jupp, P. *J. Pharm. Sci.* **2004**, 93 (6), 1440–1453.
 - (63) Artursson, P.; Karlsson, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 175 (3), 880–885.
 - (64) Behrens, I.; Kissel, T. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, 19 (5), 433–442.
 - (65) Hochman, J. H.; Chiba, M.; Nishime, J.; Yamazaki, M.; Lin, J. H. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, 292 (1), 310–318.
 - (66) Cordon-Cardo, C.; O’Brien, J. P.; Boccia, J.; Casals, D.; Bertino, J. R.; Melamed, M. R. *J*

- Histochem Cytochem* **1990**, 38 (9), 1277–1287.
- (67) Prueksaritanont, T.; Gorham, L. M.; Hochman, J. H.; Tran, L. O.; Vyas, K. P. *Drug Metab. Dispos.* **1996**, 24 (6), 634–642.
 - (68) Zhu, C.; Jiang, L.; Chen, T. M.; Hwang, K. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, 37 (5), 399–407.
 - (69) McFarland, J. W.; Avdeef, A.; Berger, C. M.; Raevsky, O. A. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, 41 (5), 1355–1359.
 - (70) Wishart, D. S.; Knox, C.; Guo, A. C.; Shrivastava, S.; Hassanali, M.; Stothard, P.; Chang, Z.; Woolsey, J. *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34 (Database issue), D668–72.
 - (71) Ran, Y.; Zhao, L.; Xu, Q.; Yalkowsky, S. H. *AAPS PharmSciTech* **2001**, 2 (1), 23–26.
 - (72) Di, L.; Whitney-Pickett, C.; Umland, J. P.; Zhang, H.; Zhang, X.; Gebhard, D. F.; Lai, Y.; Federico, J. J.; Davidson, R. E.; Smith, R.; Reyner, E. L.; Lee, C.; Feng, B.; Rotter, C.; Varma, M. V.; Kempshall, S.; Fenner, K.; El-kattan, A. F.; Liston, T. E.; Troutman, M. D. *J. Pharm. Sci.* **2011**, 100 (11), 4974–4985.
 - (73) Di, L.; Kerns, E. H.; Di, L.; Kerns, E. H. In *Drug-Like Properties*; 2016; pp 325–337.
 - (74) Gartzke, D.; Fricker, G. *J. Pharm. Sci.* **2014**, 103 (4), 1298–1304.
 - (75) Li, J.; Wang, Y.; Hidalgo, I. J. *J. Pharm. Sci.* **2013**, 102 (9), 3436–3446.
 - (76) Kuteykin-Teplyakov, K.; Luna-Tortós, C.; Ambroziak, K.; Löscher, W. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, 160 (6), 1453–1463.
 - (77) Giordanetto, F.; Kihlberg, J. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (2), 278–295.
 - (78) Driggers, E. M.; Hale, S. P.; Lee, J.; Terrett, N. K. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, 7 (7), 608–624.
 - (79) Chung, B. K. W.; Yudin, A. K. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13 (33), 8768–8779.
 - (80) Ruzza, P. *Cornea* **2009**, 70–75.
 - (81) Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85 (14), 2149–2154.
 - (82) Hughes, J. P.; Rees, S. S.; Kalindjian, S. B.; Philpott, K. L. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, 162 (6), 1239–1249.
 - (83) Fosgerau, K.; Hoffmann, T. *Drug Discov. Today* **2015**, 20 (1), 122–128.
 - (84) Uhlig, T.; Kyprianou, T.; Martinelli, F. G.; Oppici, C. A.; Heiligers, D.; Hills, D.; Calvo, X. R.; Verhaert, P. *EuPA Open Proteomics* **2014**, 4, 58–69.
 - (85) Nestor, J. J. *J. Curr. Med. Chem.* **2009**, 16 (33), 4399–4418.
 - (86) Salvesen, G. S.; Hempel, A.; Coll, N. S. *FEBS J.* **2016**, 283, 2577–2598.
 - (87) Marieb, E.; Hoehn, K. *Human Anatomy & Physiology*; 2013.
 - (88) Hamman, J. H.; Enslin, G. M.; Kotzé, A. F. *BioDrugs* **2005**, 19 (3), 165–177.
 - (89) Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S.; Price, D. *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, 81 (1), 136–147.
 - (90) Hill, T. A.; Lohman, R. J.; Hoang, H. N.; Nielsen, D. S.; Scully, C. C. G.; Kok, W. M.; Liu, L.; Lucke, A. J.; Stoermer, M. J.; Schroeder, C. I.; Chaousis, S.; Colless, B.; Bernhardt, P. V.; Edmonds, D. J.; Griffith, D. A.; Rotter, C. J.; Ruggeri, R. B.; Price, D. A.; Liras, S.; Craik, D. J.; Fairlie, D. P. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, 5 (10), 1148–1151.
 - (91) Morishita, M.; Peppas, N. A. *Drug Discov. Today* **2006**, 11 (19–20), 905–910.
 - (92) Mahato, R. I.; Narang, A. S.; Thoma, L.; Miller, D. D. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* **2003**, 20 (2–3), 153–214.
 - (93) Pauletti, G. M.; Gangwar, S.; Siahaan, T. J.; Aubé, J.; Borchardt, R. T. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, 27 (2–3), 235–256.
 - (94) Lee, H. J. *Arch. Pharm. Res.* **2002**, 25 (5), 572–584.
 - (95) Nicol, D. S. H. W.; Smith, L. F. *Nature* **1960**, 187 (4736), 483–485.
 - (96) Rochon, K.; Proteau-Gagné, A.; Bourassa, P.; Nadon, J. F.; Coôté, J.; Bournival, V.; Gobeil, F.; Guérin, B.; Dory, Y. L.; Gendron, L. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, 4 (8), 1204–1216.
 - (97) Cristina, A.; Leite, L.; Vieira, R. F.; Faria, A. R. De; Wanderley, A. G.; Afatpour, P.; Ximenes,

- P. A.; Srivastava, R. M.; Oliveira, C. F. De; Medeiros, M. V; Antunes, E.; Brondani, D. J.; Prof, R.; Sa, A. **2000**, 55, 719–724.
- (98) Furumai, R.; Matsuyama, A.; Kobashi, N.; Lee, K. H.; Nishiyama, M.; Nakajima, H.; Tanaka, A.; Komatsu, Y.; Nishino, N.; Yoshida, M.; Horinouchi, S. *Cancer Res.* **2002**, 62 (17), 4916–4921.
- (99) Shemyakin, M. M.; Shchukina, L. A.; Vinogradova, E. I.; Ravdel, G. A.; Ovchinnikov, Y. A. *Experientia* **1966**, 22 (8), 535–536.
- (100) Bramson, H. N.; Thomas, N. E.; Kaiser, E. T. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260 (29), 15452–15457.
- (101) Tourwé, D.; Couder, J.; Ceusters, M.; Meert, D.; Burks, T. F.; Kramer, T. H.; Davis, P.; Knapp, R.; Yamamura, H. I.; Leysen, J. E.; Binst, G. *Int. J. Pept. Protein Res.* **2009**, 39 (2), 131–136.
- (102) Narumi, T.; Hayashi, R.; Tomita, K.; Kobayashi, K.; Tanahara, N.; Ohno, H.; Naito, T.; Kodama, E.; Matsuoka, M.; Oishi, S.; Fujii, N. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8 (3), 616–621.
- (103) Molteni, M.; Pesenti, C.; Sani, M.; Volonterio, A.; Zanda, M. *J. Fluor. Chem.* **2004**, 125 (11 SPEC. ISS.), 1735–1743.
- (104) Bach, A.; Eildal, J. N. N.; Stühr-Hansen, N.; Deeskamp, R.; Gottschalk, M.; Pedersen, S. W.; Kristensen, A. S.; Strømgaard, K. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (5), 1333–1346.
- (105) Gentilucci, L.; De Marco, R.; Cerisoli, L. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16 (April), 3185–3203.
- (106) Ahn, J. M.; Boyle, N. A.; MacDonald, M. T.; Janda, K. D. *Mini Rev. Med. Chem.* **2002**, 2 (5), 463–473.
- (107) Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Matha, B.; Lohof, E.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H. **1999**, 3033–3040.
- (108) Madine, J.; Doig, A. J.; Middleton, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (25), 7873–7881.
- (109) Gordon, D. J.; Tappe, R.; Meredith, S. C. *J. Pept. Res.* **2002**, 60 (1), 37–55.
- (110) Adessi, C.; Frossard, M. J.; Boissard, C.; Fraga, S.; Bieler, S.; Ruckle, T.; Vilbois, F.; Robinson, S. M.; Mutter, M.; Banks, W. A.; Soto, C. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (16), 13905–13911.
- (111) White, T. R.; Renzelman, C. M.; Rand, A. C.; Rezai, T.; Mcewen, C. M.; Gelev, V. M.; Turner, R. A.; Linington, R. G.; Leung, S. S. F.; Amit, S. **2012**, 7 (11), 810–817.
- (112) Yoo, B.; Shin, S. B. Y.; Huang, M. L.; Kirshenbaum, K. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, 16 (19), 5527–5537.
- (113) Fowler, S. a; Blackwell, H. E. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7 (8), 1508–1524.
- (114) Zhang, J.; Germann, M. W. *Biopolymers* **2011**, 95 (11), 755–762.
- (115) Grathwohl, C.; Wuthrich, K. *Biopolymers* **1981**, 20, 2623–2633.
- (116) Kuntz, K. W.; Campbell, J. E.; Keilhack, H.; Pollock, R. M.; Knutson, S. K.; Porter-Scott, M.; Richon, V. M.; Sneeringer, C. J.; Wigle, T. J.; Allain, C. J.; Majer, C. R.; Moyer, M. P.; Copeland, R. A.; Chesworth, R. *J. Med. Chem.* **2016**, 59 (4), 1556–1564.
- (117) Huyskens, P.; Vandevijvere, P.; Siegel, G. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1989**, 200 (C), 555–563.
- (118) Dalling, D. K.; Grant, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89 (25), 6612–6622.
- (119) Benveniste, M.; Mayer, M. L. *Br. J. Pharmacol.* **1991**, 104 (1), 207–221.
- (120) Bolognesi, M. L.; Bartolini, M.; Cavalli, A.; Andrisano, V.; Rosini, M.; Minarini, A.; Melchiorre, C. *J. Med. Chem.* **2004**, 47 (24), 5945–5952.
- (121) Yonezawa, S.; Yamamoto, T.; Yamakawa, H.; Muto, C.; Hosono, M.; Hattori, K.; Higashino, K.; Yutsudo, T.; Iwamoto, H.; Kondo, Y.; Sakagami, M.; Togame, H.; Tanaka, Y.; Nakano, T.; Takemoto, H.; Arisawa, M.; Shuto, S. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (20), 8838–8858.
- (122) Geyer, R.; Nordemann, U.; Strasser, A.; Wittmann, H. J.; Buschauer, A. *J. Med. Chem.* **2016**, 59 (7), 3452–3470.
- (123) El Bakali, J.; Muccioli, G. G.; Body-Malapel, M.; Djouina, M.; Klupsch, F.; Ghinet, A.; Barczyk, A.; Renault, N.; Chavatte, P.; Desreumaux, P.; Lambert, D. M.; Millet, R. *ACS Med. Chem. Lett.*

- 2015**, 6 (2), 198–203.
- (124) Scott, J. S.; Brocklehurst, K. J.; Brown, H. S.; Clarke, D. S.; Coe, H.; Groombridge, S. D.; Laber, D.; Macfaul, P. A.; McKerrecher, D.; Schofield, P. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (11), 3175–3179.
 - (125) Pandya, V.; Jain, M.; Chakrabarti, G.; Soni, H.; Parmar, B.; Chaugule, B.; Patel, J.; Joshi, J.; Joshi, N.; Rath, A.; Raviya, M.; Shaikh, M.; Sairam, K. V. V. M.; Patel, H.; Patel, P. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, 21 (19), 5701–5706.
 - (126) Yudin, A. K. *Chem. Sci.* **2015**, 6 (1), 30–49.
 - (127) Marsault, E.; Peterson, M. L. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (7), 1961–2004.
 - (128) Bissantz, C.; Kuhn, B.; Stahl, M. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (14), 5061–5084.
 - (129) Klebe, G. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, 14 (2), 95–110.
 - (130) Geschwindner, S.; Ulander, J.; Johansson, P. *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (16), 6321–6335.
 - (131) Schön, A.; Madani, N.; Smith, A. B.; Lalonde, J. M.; Freire, E. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**, 77 (3), 161–165.
 - (132) Lynden-Bell, R. M.; Rasaiah, J. C. *J. Chem. Phys.* **1997**, 107 (6), 1981–1991.
 - (133) Gallicchio, E.; Kubo, M. M.; Levy, R. M. *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104 (26), 6271–6285.
 - (134) Overbeeke, P. L.; Ottosson, J.; Hult, K.; Jongejan, J.; Duine, J. *Biocatal. Biotransform.* **1999**, 17 (1), 61–79.
 - (135) Overbeeke, P. L. A.; Orrenius, S. C.; Jongejan, J. A.; Duine, J. A. *Chem. Phys. Lipids* **1998**, 93 (1–2), 81–93.
 - (136) Mallinson, J.; Collins, I. *Future Med. Chem.* **2012**, 4 (11), 1409–1438.
 - (137) Hill, T. A.; Shepherd, N. E.; Diness, F.; Fairlie, D. P. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, 53 (48), 13020–13041.
 - (138) Gavenonis, J.; Sheneman, B. A.; Siegert, T. R.; Eshelman, M. R.; Kritzer, J. A. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10 (9), 716–722.
 - (139) Glenn, M. P.; Pattenden, L. K.; Reid, R. C.; Tyssen, D. P.; Tyndall, J. D. A.; Birch, C. J.; Fairlie, D. P. *J. Med. Chem.* **2002**, 45 (2), 371–381.
 - (140) Reid, R. C.; Kelso, M. J.; Scanlon, M. J.; Fairlie, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 5673–5683.
 - (141) Pattarawarapan, M.; Zaccaro, M. C.; Saragovi, U. H.; Burgess, K. *J. Med. Chem.* **2002**, 45 (20), 4387–4390.
 - (142) Singh, Y.; Stoermer, M. J.; Lucke, A. J.; Guthrie, T.; Fairlie, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (18), 6563–6572.
 - (143) Reid, R. C.; March, D. R.; Dooley, M. J.; Bergman, D. A.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118 (36), 8511–8517.
 - (144) Jin, L.; Wang, W.; Fang, G. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, 54, 435–456.
 - (145) Yin, H.; Hamilton, A. D. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, 44 (27), 4130–4163.
 - (146) Chène, P. *ChemMedChem* **2006**, 1 (4), 400–411.
 - (147) Cummings, C. G.; Hamilton, A. D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14 (3), 341–346.
 - (148) Ottmann, C. **2013**.
 - (149) Stumpf, M. P. H.; Thorne, T.; de Silva, E.; Stewart, R.; An, H. J.; Lappe, M.; Wiuf, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105 (19), 6959–6964.
 - (150) Venkatesan, K.; Rual, J.; Vazquez, A.; Stelzl, U.; Lemmens, I.; Hirozane-Kishikawa, T.; Hao, T.; Zenkner, M.; Xin, X.; Goh, K.-I.; Yildirim, M. A.; Simonis, N.; Heinzmann, K.; Gebreab, F.; Sahalie, J. M.; Cevik, S.; Simon, C.; de Smet, A.-S.; Dann, E.; Smolyar, A.; Vinayagam, A.; Yu, H.; Szeto, D.; Borick, H.; Dricot, A.; Klitgord, N.; Murray, R. R.; Lin, C.; Lalowski, M.; Timm, J.; Rau, K.; Boone, C.; Braun, P.; Cusick, M. E.; Roth, F. P.; Hill, D. E.; Tavernier, J.; Wanker, E. E.; Barabási, A.-L.; Vidal, M. *Nat. Methods* **2009**, 6 (1), 83–90.

- (151) Sperandio, O.; Reyn??s, C. H.; Camproux, A. C.; Villoutreix, B. O. *Drug Discov. Today* **2010**, *15* (5–6), 220–229.
- (152) Tsantrizos, Y. S.; Bolger, G.; Bonneau, P.; Cameron, D. R.; Goudreau, N.; Kukolj, G.; LaPlante, S. R.; Llinàs-Brunet, M.; Nar, H.; Lamarre, D. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **2003**, *42*, 1356–1360.
- (153) Cherney, R. J.; Wang, L.; Meyer, D. T.; Xue, C.-B.; Wasserman, Z. R.; Hardman, K. D.; Welch, P. K.; Covington, M. B.; Copeland, R. A.; Arner, E. C.; DeGrado, W. F.; Decicco, C. P. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (11), 1749–1751.
- (154) LaBelle, J. L.; Katz, S. G.; Bird, G. H.; Gavathiotis, E.; Stewart, M. L.; Lawrence, C.; Fisher, J. K.; Godes, M.; Pitter, K.; Kung, A. L.; Walensky, L. D. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122* (6), 2018–2031.
- (155) Grossmann, T. N.; Yeh, J. T.-H.; Bowman, B. R.; Chu, Q.; Moellering, R. E.; Verdine, G. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (44), 17942–17947.
- (156) Moellering, R. E.; Cornejo, M.; Davis, T. N.; Bianco, C. Del; Jon, C.; Blacklow, S. C.; Kung, A. L.; Gilliland, D. G.; Gregory, L.; Bradner, J. E.; Del Bianco, C.; Aster, J. C.; Blacklow, S. C.; Kung, A. L.; Gilliland, D. G.; Verdine, G. L.; Bradner, J. E. *Nature* **2010**, *462* (7270), 182–188.
- (157) Svarstad, H.; Bugge, H. C.; Dhillon, S. S. *Biodivers. Conserv.* **2000**, *9* (11), 1521–1541.
- (158) Matsuda, S.; Koyasu, S. *Immunopharmacology* **2000**, *47* (2–3), 119–125.
- (159) Su, B.; Jacinto, E.; Hibi, M.; Kallunki, T.; Karin, M.; Ben-Neriah, Y. *Cell* **1994**, *77* (5), 727–736.
- (160) Matsuda, S.; Moriguchi, T.; Koyasu, S.; Nishida, E. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (20), 12378–12382.
- (161) Beck, J. G.; Chatterjee, J.; Laufer, B.; Kiran, M. U.; Frank, A. O.; Neubauer, S.; Ovadia, O.; Greenberg, S.; Gilon, C.; Hoffman, A.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (29), 12125–12133.
- (162) Whitty, A.; Zhong, M.; Viarengo, L.; Beglov, D.; Hall, D. R.; Vajda, S. *Drug Discov. Today* **2016**, *0* (0).
- (163) Expert Reviews in Molecular Medicine © Cambridge University Press ISSN 1462-3994.
- (164) Rink, R.; Arkema-Meter, A.; Baudoin, I.; Post, E.; Kuipers, A.; Nelemans, S. A.; Akanbi, H. J.; Moll, G. N. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2010**, *61* (2), 210–218.
- (165) Madala, P. K.; Tyndall, J. D. A.; Nall, T.; Fairlie, D. P. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (6), PR1–PR31.
- (166) Adessi, C.; Soto, C. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9* (9), 963–978.
- (167) Tugyi, R.; Mezö, G.; Fellingner, E.; Andreu, D.; Hudecz, F. *J. Pept. Sci.* **2005**, *11* (10), 642–649.
- (168) Ovadia, O.; Greenberg, S.; Chatterjee, J.; Laufer, B.; Opperer, F.; Kessler, H.; Gilon, C.; Hoffman, A. *Mol. Pharm.* **2011**, *8* (2), 479–487.
- (169) Rezai, T.; Bock, J. E.; Zhou, M. V.; Kalyanaraman, C.; Lokey, R. S.; Jacobson, M. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (43), 14073–14080.
- (170) Rezai, T.; Yu, B.; Millhauser, G. L.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (8), 2510–2511.
- (171) Over, B.; Matsson, P.; Tyrchan, C.; Artursson, P.; Doak, B. C.; Foley, M. A.; Hilgendorf, C.; Johnston, S. E.; Lee, M. D.; Lewis, R. J.; McCarren, P.; Muncipinto, G.; Norinder, U.; Perry, M. W. D.; Duvall, J. R.; Kihlberg, J. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12* (October).
- (172) Schwochert, J.; Turner, R.; Thang, M.; Berkeley, R. F.; Ponkey, A. R.; Rodriguez, K. M.; Leung, S. S. F.; Khunte, B.; Goetz, G.; Limberakis, C.; Kalgutkar, A. S.; Eng, H.; Shapiro, M. J.; Mathiowetz, A. M.; Price, D. A.; Liras, S.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S. *Org. Lett.* **2015**, *17* (12), 2928–2931.
- (173) Geng, H.; Jiang, F.; Wu, Y.-D. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, acs.jpcllett.6b00452.
- (174) Tyndall, J. D.; Fairlie, D. P. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8* (8), 893–907.

- (175) Hoveyda, H. R.; Marsault, E.; Gagnon, R.; Mathieu, A. P.; V??zina, M.; Landry, A.; Wang, Z.; Benakli, K.; Beaubien, S.; Saint-Louis, C.; Brassard, M.; Pinault, J. F.; Ouellet, L.; Bhat, S.; Ramaseshan, M.; Peng, X.; Foucher, L.; Beauchemin, S.; Bh??rer, P.; Veber, D. F.; Peterson, M. L.; Fraser, G. L. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (24), 8305–8320.
- (176) Nantermet, P. G.; Barrow, J. C.; Newton, C. L.; Pellicore, J. M.; Young, M.; Lewis, S. D.; Lucas, B. J.; Krueger, J. A.; McMasters, D. R.; Yan, Y.; Kuo, L. C.; Vacca, J. P.; Selnick, H. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13* (16), 2781–2784.
- (177) Hewitt, W. M.; Leung, S. S. F.; Pye, C. R.; Ponkey, A. R.; Bednarek, M.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (2), 715–721.
- (178) Rand, A. C.; Leung, S. S. F.; Eng, H.; Rotter, C. J.; Sharma, R.; Kalgutkar, A. S.; Zhang, Y.; Varma, M. V.; Farley, K. A.; Khunte, B.; Limberakis, C.; Price, D. A.; Liras, S.; Mathiowetz, A. M.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3* (10), 1282–1289.
- (179) Schwochert, J.; Lao, Y.; Pye, C. R.; Naylor, M. R.; Desai, P. V.; Gonzalez Valcarcel, I. C.; Barrett, J. A.; Sawada, G.; Blanco, M. J.; Lokey, R. S. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7* (8), 757–761.
- (180) Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89* (20), 9367–9371.
- (181) Blaser, H. U.; Spindler, F.; Studer, M. *Appl. Catal. A Gen.* **2001**, *221* (1–2), 119–143.
- (182) Tetsuo Ohta, Hidemasa Takaya, Masato Kitamura, Katsunori Nagai, R. N. *J. Org. Chem* **1987**, *52*, 3174–3176.
- (183) Orwig, K. S.; Dix, T. A. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (41), 7007–7009.
- (184) Carpino, L. a; Han, G. Y. *J. Org. Chem.* **1972**, *37* (22), 3404–3409.
- (185) Wang, S.-S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95* (4), 1328–1333.
- (186) Culf, A. S.; Ouellette, R. J. *Molecules* **2010**, *15* (8), 5282–5335.
- (187) Davies, J. S. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9* (8), 471–501.
- (188) Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Kent, S. B. H.; Moos, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (26), 10646–10647.
- (189) Humphrey, J. M.; Chamberlin, a. R. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (6), 2243–2266.
- (190) Goodman, M.; Levine, L. *J. Am. Chem. Soc* **1964**, *86* (13), 2918–2922.
- (191) Anelli, P. L.; Biffi, C.; Montanari, F.; Quici, S. *J. Org. Chem.* **1987**, *52* (4), 2559–2562.
- (192) Wadsworth, W. S.; Emmons, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83* (7), 1733–1738.
- (193) Hoyer, T. R.; Jeffrey, C. S.; Shao, F. *Nat Protoc* **2007**, *2* (10), 2451–2458.
- (194) Evans, D. a; Bartroli, J.; Shih, T. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (8), 2109–2127.
- (195) Evans, D. A.; Britton, T. C.; Ellman, J. A. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (49), 6141–6144.
- (196) Curtius, T. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1890**, *23* (2), 3023–3033.
- (197) Djerassi, C.; Engle, R. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75* (15), 3838–3840.
- (198) Heilbron, M.; Jones, E. R. H. *J. Chem. Soc.* **1946**, No. Xii, 39–45.
- (199) Dess, D. B.; Martin, J. C. *J. Org. Chem.* **1983**, *48* (22), 4155–4156.
- (200) Fatiadi, A. J. *Synthesis (Stuttg.)* **1987**, *1987* (2), 85–127.
- (201) Tollens, B. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1882**, *15* (2), 1635–1639.
- (202) Travis, B. R.; Sivakumar, M.; Hollist, G. O.; Borhan, B. *Org. Lett.* **2003**, *5* (7), 1031–1034.
- (203) Corey, E. J.; Schmidt, G. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20* (5), 399–402.
- (204) Haworth, W. N. *J. Chem. Soc., Trans.* **1915**, *107*, 8–16.
- (205) Stodola, F. H. *J. Org. Chem.* **1964**, *29* (8), 2490–2491.
- (206) Brenner, M.; Huber, W. *Helv. Chim. Acta* **1953**, *36* (5), 1109–1115.
- (207) Nudelman, A.; Bechor, Y.; Falb, E.; Fischer, B.; Wexler, B. a.; Nudelman, A. *Synth. Commun.*

- 1998, 28 (3), 471–474.
- (208) Dolby, L.; Debono, M. *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 2306–2310.
- (209) Raptis, C.; Lykakis, I. N.; Tsangarakis, C.; Stratakis, M. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, 15 (44), 11918–11927.
- (210) Pechmann, H. V. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1894**, 27 (2), 1888–1891.
- (211) Semmler, F. W. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1891**, 24 (1), 201–211.
- (212) Shioiri, T.; Ninomiya, K.; Yamada, S. *J. Amer. Chem. Soc.* **1972**, 94 (17), 6203–6205.
- (213) Lebel, H.; Leogane, O. *Org. Lett.* **2005**, 7 (19), 4107–4110.
- (214) Wiesner, K.; Valenta, Z.; Orr, D. E.; Liede, V.; Kohan, G. *Can. J. Chem.* **1968**, 46 (23), 3617–3624.
- (215) Ogawa, H.; Iwasaki, A.; Sumimoto, S.; Kanamori, Y.; Ohno, O.; Iwatsuki, M.; Ishiyama, A.; Hokari, R.; Otoguro, K.; Omura, S.; Suenaga, K. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79 (7), 1862–1866.
- (216) Kula, J. *Chem. Heal. Saf.* **1999**, 6 (6), 21–22.
- (217) Sibi, M. P. *Tetrahedron* **2002**, 58 (617), 7991–8035.
- (218) Bachmann, W. E.; Struve, W. S. *Organic Reactions*. 1942, pp 38–54.
- (219) Leggio, A.; Liguori, A.; Procopio, A.; Sindona, G. **1997**, 1969–1971.
- (220) Szántay, C.; Töke, L.; Kolonits, P. *J. Org. Chem.* **1966**, 31 (5), 1447–1451.
- (221) Walker, E. R. H. *Chem. Soc. Rev.* **1976**, 5, 23.
- (222) Martinez, J.; Tolle, J. C.; Bodanszky, M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **2009**, 13 (1), 22–27.
- (223) Barlos, K.; Chatzi, O.; Gatos, D.; Stavropoulos, G. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 37 (1), 513–520.
- (224) Yang, Y.; Yang, Y. In *Side Reactions in Peptide Synthesis*; 2016; pp 257–292.
- (225) Sucholeiki, I. In *High-Throughput Synthesis*; CRC Press, 2001; pp 2–26.
- (226) Murza, A.; Sainsily, X.; Côté, J.; Bruneau-Cossette, L.; Besserer-Offroy, É.; Longpré, J.-M.; Leduc, R.; Dumaine, R.; Lesur, O.; Auger-Messier, M.; Sarret, P.; Marsault, É. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 28–31.
- (227) Treder, A. P.; Hickey, J. L.; Tremblay, M. C. J.; Zaretsky, S.; Scully, C. C. G.; Mancuso, J.; Doucet, A.; Yudin, A. K.; Marsault, E. *Chem. - A Eur. J.* **2015**, 21 (25), 9249–9255.
- (228) Traboulsi, H.; Larkin, H.; Bonin, M. A.; Volkov, L.; Lavoie, C. L.; Marsault, É. *Bioconjug. Chem.* **2015**, 26 (3), 405–411.
- (229) Li, H.; Jiang, X.; Ye, Y. H.; Fan, C.; Romoff, T.; Goodman, M. *Org. Lett.* **1999**, 1 (1), 91–93.
- (230) Ye, Y. H.; Li, H.; Jiang, X. *Biopolym. - Pept. Sci. Sect.* **2005**, 80 (2–3), 172–178.
- (231) Dieckmann, M.; Rudolph, S.; Dreisigacker, S.; Menche, D. *J. Org. Chem.* **2012**, 77 (23), 10782–10788.
- (232) Boger, D. L. *Med. Res. Rev.* **2001**, 21 (5), 356–381.
- (233) Davis, M. R.; Singh, E. K.; Wahyudi, H.; Alexander, L. D.; Kunicki, J. B.; Nazarova, L. A.; Fairweather, K. A.; Giltrap, A. M.; Jolliffe, K. A.; McAlpine, S. R. *Tetrahedron* **2012**, 68 (4), 1029–1051.
- (234) Joullie, M. M.; Lassen, K. M. *Arkivoc* **2010**, 2010 (8), 189–250.
- (235) Collins, J. C.; James, K. *Medchemcomm* **2012**, 3 (12), 1489.
- (236) Da Violante, G.; Zerrouk, N.; Richard, I.; Provot, G.; Chaumeil, J. C.; Arnaud, P.; Violante, G. Da; Haumeil, J. C. C.; Rnaud, P. A.; Da Violante, G.; Zerrouk, N.; Richard, I.; Provot, G.; Chaumeil, J. C.; Arnaud, P.; Violante, G. Da; Haumeil, J. C. C.; Rnaud, P. A.; Da Violante, G.; Zerrouk, N.; Richard, I.; Provot, G.; Chaumeil, J. C.; Arnaud, P.; Violante, G. Da; Haumeil, J. C. C.; Rnaud, P. A. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25 (12), 1600–1603.
- (237) Kohlmann, M. In *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays*; Vogel, H. G., Maas, J., Hock, F. J., Mayer, D., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg,

- 2013; pp 779–797.
- (238) Le Dévédec, F.; Strandman, S.; Hildgen, P.; Leclair, G.; Zhu, X. X. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (8), 3057–3066.
 - (239) Besylate, A.; Suspensions, O. **2016**, *69* (4), 93.
 - (240) Sullivan, T.; Forest, J.-M.; Leclair, G. *Hosp. Pharm.* **2015**, *50* (3), 214–220.
 - (241) Sawada, G. A.; Barsuhn, C. L.; Lutzke, B. S.; Houghton, M. E.; Padbury, G. E.; Ho, N. F.; Raub, T. J. *J Pharmacol Exp Ther* **1999**, *288* (3), 1317–1326.
 - (242) Sushko, I.; Novotarskyi, S.; Körner, R.; Pandey, A. K.; Rupp, M.; Teetz, W.; Brandmaier, S.; Abdelaziz, A.; Prokopenko, V. V.; Tanchuk, V. Y.; Todeschini, R.; Varnek, A.; Marcou, G.; Ertl, P.; Potemkin, V.; Grishina, M.; Gasteiger, J.; Schwab, C.; Baskin, I. I.; Palyulin, V. A.; Radchenko, E. V.; Welsh, W. J.; Kholodovych, V.; Chekmarev, D.; Cherkasov, A.; Aires-de-Sousa, J.; Zhang, Q.-Y.; Bender, A.; Nigsch, F.; Patiny, L.; Williams, A.; Tkachenko, V.; Tetko, I. V. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2011**, *25* (6), 533–554.
 - (243) van de Waterbeemd, H.; Karajiannis, H.; El Tayar, N. *Amino Acids* **1994**, *7* (2), 129–145.
 - (244) Frost, J. R.; Scully, C. C. G.; Yudin, A. K. *Nat. Chem.* **2016**, *8* (12), 1105–1111.
 - (245) Nielsen, D. S.; Lohman, R. J.; Hoang, H. N.; Hill, T. A.; Jones, A.; Lucke, A. J.; Fairlie, D. P. *ChemBioChem* **2015**, *16* (16), 2289–2293.
 - (246) Cierpicki, T.; Otlewski, J. *J. Biomol. NMR* **2001**, *21* (3), 249–261.
 - (247) Nielsen, D. S.; Hoang, H. N.; Lohman, R. J.; Hill, T. A.; Lucke, A. J.; Craik, D. J.; Edmonds, D. J.; Griffith, D. A.; Rotter, C. J.; Ruggeri, R. B.; Price, D. A.; Liras, S.; Fairlie, D. P. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53* (45), 12059–12063.
 - (248) Van Gorkom, M.; Hall, G. E. *Chem. Soc. Rev.* **1968**, *22* (4), 14–29.

ANNEXE 1 : PARTIE EXPÉRIMENTALE

Remarques générales

Toutes les réactions ont été effectuées sous atmosphère d'argon dans de la verrerie séchée à la flamme. Les solvants anhydres et certains réactifs liquides ont été achetés chez EMD Millipore DrySolv® ou distillés avant leur utilisation, et ils sont rapportés dans le tableau G.1 suivant.

Tableau G.1 : Agents desséchants utilisés pour la distillation de différents solvants et réactifs.

Solvant / Réactif distillé	Agent desséchant
Dichlorométhane	Hydruure de calcium
Méthanol	Mg ⁰ et I ₂
Tétrahydrofurane	Sodium, Benzophénone
Toluène	Hydruure de calcium

Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur des plaques de verre recouvertes de gel de silice (0.25 mm, Silicycle). Les produits en chromatographie sur couche mince ont été révélés à la lampe UV, puis par trempage dans une solution aqueuse de KMnO₄, dans une solution de vanilline ou dans une solution de ninhydrine, suivi d'un chauffage. Les chromatographies éclair ont été effectuées avec du gel de silice (40-63 µm, Silicycle).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (¹H, ¹³C, TOCSY, COSY, ROESY, HSQC) ont été enregistrés avec un appareil Bruker Ascend™ 400. L'étalon interne est le chloroforme (7.27 ppm), le DMSO (2.50 ppm) ou le méthanol (3.31 ppm) pour la résonance des protons et le chloroforme (77.0 ppm), le DMSO (39.5 ppm) ou le méthanol (49.2 ppm) pour la résonance des carbones.

Les spectres UV et spectres de masse ont été enregistrés avec un UPLC/MS « Acquity H-Class UPLC-MS » équipé d'une colonne BEH C18 (50 × 2.1 mm, 1.7 µm spherical particle size) avec un flux de 0.8 mL/min sur 2.5 minutes dans un gradient de 5–95% acétonitrile dans l'eau + 0.1% d'acide formique dans les deux solvants. Le système UPLC-MS et les colonnes ont été achetées chez Waters (Canada).

Les macrocycles finaux ont été purifiés sur un appareil HPLC préparatif (Waters Sample Manager 2767, Binary gradient module 2545, SQ Detector 2) équipé d'une colonne XSelect Peptide CSH C18 OBD Prep

Column (100 x 19 mm, 5 μ m spherical particle size) avec un flux de 20 mL/min sur 15 minutes dans différents gradients d'acétonitrile dans l'eau + 0.1% d'acide formique dans les deux solvants.

L'essai PAMPA a été fait sur des plaques-filtres 96 puits PVDF hydrophobes 0.45 μ m de 200 μ L (Millipore MAIPNTR10) et des plaques réceptrices de 300 μ L (Millipore MATRNPS50).

L'essai Caco-2 a été fait sur des plaques Transwell en polycarbonate (Corning, 3379) avec des filtres hydrophiles 0.45 μ m (Millipore HVLP04700).

Modes opératoires

Loading and capping procedure: To Wang resin (200 mg, nominal loading: 1.5 mmol/g) was added anhydrous THF (2 mL) and the mixture was left for 30 min. Meanwhile, a solution of the first amino acid (3 eq.) was prepared in anh. THF (2 mL). To this solution was added PPh_3 (3 eq.) and DIAD (3 eq.) The THF from the resin solution was removed by filtration and the amino acid solution was added. The mixture was left on an orbital shaker overnight. The resin was then filtered and washed in the following sequence: 3x DMF, 3x DMC, 3x iPrOH, 3x DCM, 3x iPrOH, 3x DCM. A freshly prepared solution of DCM: Ac_2O :DIPEA (15:2:1, 2 mL) was then added and the mixture was left on an orbital shaker for 30 min, after which it was washed using the same sequence as above.

Loading procedure for Nphe: To 2-chlorotrityl chloride resin (200 mg, nominal loading: 1.2 mmol/g) was added anhydrous DCM (2 mL) and the mixture was left for 30 min. Meanwhile, a solution of bromoacetic acid (4 eq.) was prepared in anh. DCM (2 mL). To this solution was added DIPEA (8 eq.) The DCM from the resin solution was removed by filtration and the amino acid solution was added. The mixture was left on an orbital shaker for 1 hour. The resin was then filtered and washed 6 times with DMF. A solution of benzylamine (20 eq.) in DMF (2 mL) was added and the mixture was left on an orbital shaker for 1 hour. The resin was then filtered and washed 6 times with DMF.

Deprotection procedure: To the resin (200 mg) was added a solution of 20% piperidine in DMF (2 mL) and the mixture was left on an orbital shaker for 20 min. The resin was then washed twice with DMF and a solution of 20% piperidine in DMF (2 mL) was added once more, then left on the orbital shaker for another 20 min. The resin was then washed 6 times with DMF.

Coupling procedure for amino acids and Nala: A solution of amino acid (3 eq.) and HATU (2.5 eq.) in DMF (2 mL) was prepared, then DIPEA (5 eq.) was added. The resulting yellow solution was added to the deprotected resin and left on the orbital shaker for 3 hours. The resin was then filtered and washed in the following sequence: 3x DMF, 3x DMC, 3x iPrOH, 3x DCM, 3x iPrOH, 3x DCM.

Coupling procedure for Nleu: A solution of bromoacetic acid (6.8 eq.) and DIC (8 eq.) in DMF (2 mL) was added to the deprotected resin and left on the orbital shaker for 1 hour. The resin was then filtered and washed 6 times with DMF. A solution of isobutylamine (20 eq.) in DMF (2 mL) was then

added to the resin and left on the orbital shaker for 1 hour. The resin was then filtered and washed 6 times with DMF.

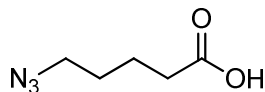
Cleavage and deprotection procedure: A 50% solution of TFA in DCM was added to the resin and the mixture was left on the orbital shaker for 1 hour. The solution was then filtered and concentrated under reduced pressure, adding DCM when almost dry (3x) to remove most of the TFA.

Macrocyclization procedure: The linear peptide was dissolved in DMF (0.025 mol/L), DEPBT was added (1.1 eq.), followed by DIPEA (3 eq.). The resulting yellow solution was left to stir until completion, typically around 72 hours. It was then filtered on a carbonate scavenging cartridge and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified on a preparative HPLC-MS.

PAMPA assay: The assay was carried with 10 μ L membrane (2% lecithin in dodecane), using a 100 μ M solution in a phosphate buffer (pH = 6.4) and shaken for 17 hours (25°C, 50 rpm).

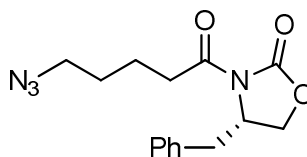
Caco-2 assay: Caco-2 cells were passaged 38 times, and grown on the filter for 22 days, at which point the transepithelial electrical resistance (TEER) was over 300 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Compounds were tested in an initial 10 μ M solution using a HBSS buffer (HEPES/NaOH, pH = 7.4) and a sample was taken every hour for three hours at 37°C.

5-Azidovaleric acid (9)



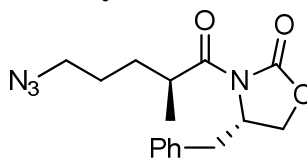
5-Bromovaleric acid (5.00 g, 27.6 mmol, 1 eq.) was dissolved in DMSO (275 mL, 0.1 M), sodium azide (7.18 g, 110 mmol, 4 eq.) was added and the mixture was stirred overnight. Upon completion, 1 M HCl was added (300 mL) and the solution extracted with ethyl acetate (3 x 300 mL). The organic phases were combined and washed with a 1:1 mixture of brine and 1 M HCl (6 x 300 mL), dried using MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to obtain an orange oil (4.05 g, quantitative) that was used directly for next step. **^1H NMR (300 MHz, CDCl_3):** δ 11.42 (1H, s), 3.31 (2H, t, J = 6.6 Hz), 2.40 (2H, t, J = 7.2 Hz), 1.77-1.61 (4H, m); **^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3):** δ 178.0, 51.0, 33.3, 28.2, 21.8; **HRMS [M-H] $^-$** calcd for $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$: 142.0611, found: 142.0621.

1-[(4*S*)-4-Benzyl-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]-5-azido-1-pentanone (10)



5-Azidovaleric acid (3.95 g, 27.6 mmol, 1 eq.) was dissolved in THF (92 mL, 0.3 M) and the solution was cooled to -78 °C. Triethylamine (4.62 mL, 33.1 mmol, 1.2 eq.) was added, followed by trimethylacetyl chloride (3.74 mL, 30.4 mmol, 1.1 eq.) and the solution was left to stir and warm up to 0 °C for 1 h. In a separate flask, (S)-4-Benzyl-2-oxazolidinone (5.87 g, 33.1 mmol, 1.2 eq.) was dissolved in THF (39 mL, 0.7 M) and cooled to -78 °C. To this solution was added a solution of *n*-Butyllithium in hexanes (33.1 mmol, 1.2 eq.) dropwise. The solution containing the azide was cooled back to -78 °C and the oxazolidinone solution was added to it by canula. It was left to stir and warm up to 0 °C for 2 h. When completed, the solution was poured into sat. NH₄Cl (300 mL) and extracted with EtOAc (3 x 300 mL). The organic fractions were merged, washed with brine (1 x 300 mL), dried using MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain an orange oil. This crude product was purified by flash chromatography (7:3 hexanes/ethyl acetate), yielding a colourless oil (6.06 g, 73%). **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 7.40-7.25 (3H, m), 7.24-7.17 (2H, m), 4.74-4.63 (1H, m), 4.27-4.16 (3H, m), 3.39-3.25 (3H, m), 3.10-2.87 (2H, m); 1.87-1.64 (4H, m) **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ 172.3, 153.4, 135.2, 129.4, 128.9, 127.3, 66.2, 55.1, 51.1, 37.9, 34.9, 28.2, 21.3; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₁₅H₁₈N₄O₃: 325.1271, found: 325.1278.

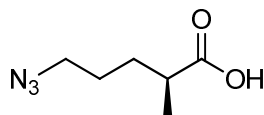
(2S)-1-[(4S)-4-Benzyl-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]-5-azido-2-methyl-1-pentanone (11)



1-[(4S)-4-Benzyl-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]-5-azido-1-pentanone (6.06 g, 20.0 mmol, 1 eq.) was dissolved in THF (10 mL, 2 M) and cooled to -78 °C. In a separate vessel, a 0.5 M solution of potassium bis(trimethylsilyl)amide in toluene (56 mL, 28.1 mmol, 1.4 eq.) was dissolved in cold (-78 °C) THF (134 mL, 0.15 M). The solution containing the oxazolidinone was then added by canula to the KHMDS solution and left to stir for 30 minutes. Methyl iodide (3.74 mL, 60 mmol, 3 eq.) was added and was left stir and warm up to 0 °C during 2 h. The reaction mixture was then poured into a saturated solution of NH₄Cl and the product was extracted with ethyl acetate (3 x 500 mL). The organic fractions were merged, washed with brine (1 x 500 mL), dried using MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain a crude yellow oil (6.74 g, quant., de = 69%) which was used directly

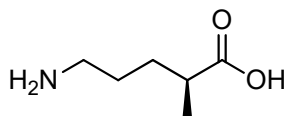
for the next step. **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 7.40-7.25 (3H, m), 7.25-7.15 (2H, m), 4.75-4.65 (1H, m), 4.28-4.15 (2H, m), 3.82-3.67 (1H, m), 3.39-3.20 (3H, m), 2.78 (1H, dd, J = 13.1, 9.6 Hz), 1.92-1.77 (1H, m), 1.73-1.43 (3H, m), 1.26 (3H, d, J = 6.8 Hz) **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ 176.6, 153.0, 135.1, 129.4, 128.9, 127.4, 66.1, 55.2, 51.3, 37.9, 37.4, 30.3, 26.6, 17.5; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₁₆H₂₀N₄O₃: 339.1428, found: 339.1430.

(2S)-5-Azido-2-methylvaleric acid (12)



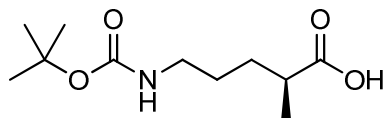
(2S)-1-[(4S)-4-Benzyl-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]-5-azido-2-methyl-1-pentanone (1.51 g, 4.77 mmol, 1 eq.) was dissolved in THF:H₂O (3:1, 100 mL, 0.05 M) and the solution was cooled to 0 °C. Hydrogen peroxide (2.70 mL, 23.8 mmol, 5 eq.) was added, followed by lithium hydroxide (228 mg, 9.52 mmol, 2 eq.) and the solution was left to stir until completion (approximately 20 minutes). A saturated solution of sodium sulfite was added (5 mL) and the solution was concentrated under reduced pressure to remove most of the THF. A saturated solution of sodium bicarbonate (100 mL) was added the product was washed with dichloromethane (3 x 100 mL). The aqueous phase was acidified to pH = 1 using 1 M HCl and extracted with ethyl acetate (3 x 100 mL). The ethyl acetate fractions were combined, dried using MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain a colourless oil (730 mg, 98%). **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 10.61 (1H, s), 3.30 (2H, t, J = 6.6 Hz), 2.57-2.44 (1H, m), 1.83-1.48 (4H, m), 1.22 (3H, d, J = 6.9 Hz); **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ 182.2, 51.2, 38.9, 30.5, 26.5, 16.9; **HRMS [M-H]⁻** calcd for C₆H₁₁N₃O₂: 156.0768, found: 156.0772.

(2S)-5-Amino-2-methylvaleric acid



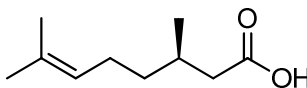
(2S)-5-Azido-2-methylvaleric acid (3.04 g, 19.3 mmol, 1 eq.) was dissolved in methanol (40 mL, 0.5 M) with 5% (v/v, 2 mL) acetic acid, palladium on carbon (10% wt) was added (310 mg) and the solution was put under 300 psi of hydrogen and shaken for 16 h. The Pd/C was removed by filtration over a Celite pad and the solution was concentrated under reduced pressure to obtain a colourless oil in quantitative yield. This crude product was used directly in the next step.

(2S)-2-Methyl-5-(tert-butoxycarbonylamino)valeric acid (13)

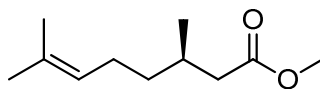


(2*S*)-5-Amino-2-methylvaleric acid (2.54 g, 19.4 mmol, 1 eq.) was dissolved in a 2:1 mixture of dioxane and water (60 mL, 0.3 M) and sodium bicarbonate was added until pH reached 8. Di-*tert*-butyl dicarbonate (4.65 g, 21.3 mmol, 1.1 eq.) was added and the solution was stirred for 16 h. Upon completion, the dioxane was removed under reduced pressure, 1 M HCl was added (100 mL) and the product was extracted with ethyl acetate (3 x 100 mL). The organic fractions were combined, dried using MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain a colourless oil (3.50 g, 78%). The product was isolated by flash chromatography (DCM/MeOH, 95:5) and coevaporated multiple times with toluene to yield a colourless oil (1.73 g, 39%). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 5.75 (0.2H, br s), 4.60 (0.8H, br s), 3.13 (2H, br t), 2.55-2.43 (1H, m), 1.77-1.63 (1H, m), 1.59-1.49 (3H, m), 1.45 (9H, s), 1.20 (3H, d, J = 7.0 Hz); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 181.8, 156.0, 79.3, 40.3, 39.0, 30.6, 28.4, 27.7, 16.9; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₁₁H₂₁NO₄: 254.1363, found: 254.1368.

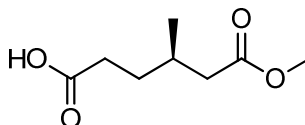
(3*R*)-3,7-Dimethyl-6-octenoic acid (15)



(3*R*)-3,7-Dimethyl-6-octen-1-ol (5.00 g, 32.0 mmol, 1 eq.) was dissolved in DMF (100 mL, 0.3 M) and pyridinium dichromate (60.2 g, 160 mmol, 5 eq.) was added. The solution was stirred for 16 h. Upon completion, diethyl ether (300 mL) was added and the mixture was washed with half-sat. NH₄Cl (6 x 300 mL) and brine (1 x 300 mL). The organic fractions were combined, dried using MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain a colourless oil. The product was isolated by flash chromatography (Hexanes/EtOAc, 17:3) to yield a colourless oil (3.93 g, 72%). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 11.50 (1H, br s), 5.15-5.05 (1H, m), 2.38 (1H, dd, J = 15.4, 5.9 Hz), 2.16 (1H, dd, J = 15.4, 8.0 Hz), 2.07-1.92 (3H, m), 1.69 (3H, d, J = 1.0 Hz), 1.61 (3H, s), 1.45-1.34 (1H, m), 1.31-1.21 (1H, m), 0.99 (3H, d, J = 6.6 Hz); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 179.4, 131.7, 124.1, 41.5, 36.7, 29.8, 25.7, 25.4, 19.6, 17.6; **HRMS [M-H]⁻** calcd for C₁₀H₁₈O₂: 169.1223, found: 169.1233.

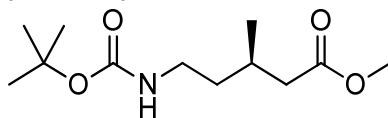
Methyl (3R)-3,7-dimethyl-6-octenoate (16)

(3R)-3,7-Dimethyl-6-octenoic acid (2.51 g, 14.7 mmol, 1 eq.) was dissolved in diethyl ether (50 mL, 0.3 M). A solution of diazomethane (73.7 mmol, 5 eq.) in diethyl ether (200 mL, 0.37 M) was added and the reaction was stirred for 2 h. Upon completion, drops of acetic acid were added until the solution became colourless. The solvent was concentrated by reduced pressure to yield a slightly yellow oil (2.60 g, 61%). **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 5.14-5.04 (1H, m), 3.67 (3H, s), 2.33 (1H, dd, J = 14.8, 5.9 Hz), 2.12 (1H, dd, J = 15.2, 8.1 Hz), 2.06-1.87 (3H, m), 1.69 (3H, d, J = 0.9 Hz), 1.61 (3H, s), 1.43-1.16 (3H, m), 0.95 (3H, 6.6 Hz); **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ 173.7, 131.5, 124.2, 51.3, 41.6, 36.7, 30.0, 25.7, 25.4, 19.6, 17.6; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₁₁H₂₀O₂: 207.1356, found: 207.1358.

(4R)-5-Methoxycarbonyl-4-methylvaleric acid (17)

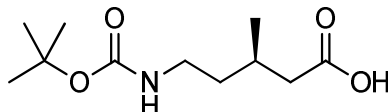
Methyl (3R)-3,7-dimethyl-6-octenoate (2.60 g, 14.1 mmol, 1 eq.) was dissolved in a 2:2:3 mixture of carbon tetrachloride (40 mL), acetonitrile (40 mL) and water (60 mL). Sodium periodate (12.4 g, 57.9 mmol, 4.1 eq.) was added, followed by ruthenium(III) chloride (65 mg, 0.31 mmol, 2.2 mol-%). The resulting heterogenous solution was stirred vigorously for 2 h or until completion. 1 M HCl was added and the product was extracted with dichloromethane (3 x 200 mL). The organic fractions were combined and concentrated under reduced pressure, then resolubilized in ethyl acetate and extracted with dil. NaHCO₃ (3 x 200 mL). The aqueous phase was acidified to pH 1 using 1 M HCl and extracted with ethyl acetate (5 x 200 mL). The organic fractions from the last extraction were combined, dried using MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain a colourless oil (1.65 g, 67%). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 3.67 (3H, s), 2.46-2.26 (3H, m), 2.23-2.12 (1H, m), 2.07-1.93 (1H, m), 1.77-1.64 (1H, m), 1.61-1.47 (1H, m), 0.96 (3H, d, J = 6.7 Hz); **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 179.0, 173.2, 51.5, 41.2, 31.5, 31.2, 29.8, 19.3; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₈H₁₄O₄: 197.0784, found: 197.0786.

Methyl (3*R*)-3-methyl-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)valerate (18)



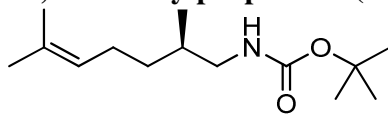
(4*R*)-5-Methoxycarbonyl-4-methylvaleric acid (2.30 g, 13.2 mmol, 1 eq.) was dissolved in *tert*-butanol (130 mL, 0.1 M), then diphenylphosphoryl azide (3.13 mL, 14.5 mmol, 1.1 eq.) was added, followed by triethylamine (2.02 mL, 14.5 mmol, 1.1 eq.) and the mixture was refluxed for 16 h. Upon completion, the solvent was concentrated under reduced pressure and dissolved in ethyl acetate (100 mL). It was washed with half-sat. NaHCO₃ (2 x 100 mL), water (2 x 100 mL) and brine (1 x 100 mL). The organic fractions were combined, filtered through a pad of Celite, dried using MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain an orange oil (2.36 g, 73%) which was used without further purification. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 4.66 (1H, br s), 3.61 (3H, s), 3.18-2.95 (2H, m), 2.27 (1H, dd, J = 15.0, 6.3 Hz), 2.11 (1H, dd, J = 15.1, 7.7 Hz), 2.03-1.90 (1H, m), 1.52-1.41 (1H, m), 1.38 (9H, s), 1.35-1.28 (1H, m), 0.91 (3H, d, J = 6.7 Hz); **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₁₂H₂₃NO₄: 268.1519, found: 268.1518.

(3*R*)-3-Methyl-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)valeric acid (19)



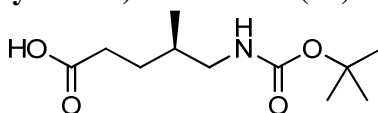
Methyl (3*R*)-3-methyl-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)valerate (571 mg, 2.33 mmol, 1 eq.) was dissolved in methanol (12 mL, 0.2 M), 1 M NaOH was added (12 mL, 12 mmol, 5 eq.) and the reaction was left to stir for 3 h. Upon completion, 1 M HCl was added to pH 2 and the product was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The organic fractions were combined, dried using MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain a colourless oil (541 mg, quant.) The product was isolated by flash chromatography (DCM/MeOH, 19:1) to afford a colourless oil (484 mg, 90%). **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 10.64 (1H, br s), 6.05 (0.3H, s), 4.67 (0.7H, s), 3.12 (2H, s), 2.43-2.26 (1H, m), 2.18 (1H, dd, J = 15.3, 7.5 Hz), 2.10-1.90 (1H, m), 1.65-1.48 (1H, m), 1.43 (9H, s), 0.98 (3H, 7.4 Hz); **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** 178.2, 156.1, 79.3, 41.3, 38.3, 36.5, 28.3, 27.5, 19.5; **HRMS [M-H]⁻** calcd for C₁₁H₂₁NO₄: 230.1387, found: 230.1388.

(2R)-2,6-Dimethyl-5-heptenylamino 2,2-dimethylpropionate (23)



(3R)-3,7-Dimethyl-6-octenoic acid (2.03 g, 11.9 mmol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous THF (120 mL, 0.1 M) and the following reagents were added, in order: sodium azide (2.72 g, 3.5 eq.), zinc trifluoromethanesulfonate (143 mg, 0.394 mmol, 3.3 mol-%), tetrabutylammonium bromide (577 mg, 1.79 mmol, 15 mol-%), *tert*-butanol (571 μ L, 5.97 mmol, 0.5 eq.) and di-*tert*-butyl dicarbonate (2.87 g, 13.13 mmol, 1.1 eq.) The mixture was left to stir for 16 h. Upon completion, a 10% w/v sodium nitrite solution was added (240 mL), followed by 120 mL of ethyl acetate and the mixture was left to stir for 10 min. The two phases were separated and the remaining aqueous phase was extracted with further portions of ethyl acetate (3 x 120 mL). The organic phases were combined, washed with NH_4Cl (2 x 250 mL), NaHCO_3 (2 x 250 mL) and brine (1 x 250 mL), dried using MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to obtain a yellow oil (2.76 g, 96%) The product was isolated by flash chromatography (hexanes/EtOAc, 9:1) to afford a colourless oil (1.30 g, 45%). **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3):** δ 5.13-5.04 (1H, m), 4.55 (1H, s), 3.15-2.80 (2H, m), 2.09-1.90 (2H, m), 1.68 (3H, d, $J = 0.9$ Hz); 1.66-1.54 (1H, m), 1.60 (3H, s), 1.45 (9H, s), 1.42-1.31 (1H, m), 1.20-1.07 (1H, m), 0.90 (3H, d, $J = 6.8$ Hz); **^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3):** 156.1, 131.5, 124.4, 79.0, 46.5, 34.3, 33.2, 28.4, 25.7, 25.3, 17.6, 17.4; **HRMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$** calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{NO}_2$: 264.1934, found: 264.1939.

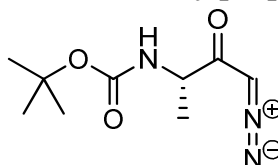
(4R)-4-Methyl-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)valeric acid (24)



(2R)-2,6-Dimethyl-5-heptenylamino 2,2-dimethylpropionate (2.40 g, 9.96 mmol, 1 eq.) was dissolved in methanol (50 mL, 0.2 M) and chilled to -78°C . Ozone was bubbled through the solution for 45 min. followed by oxygen for 30 min. The flask was removed from the cooling bath and 30% hydrogen peroxide was added (5.64 mL, 49.7 mmol, 5 eq.), followed by 1 M sodium hydroxide (20 mL, 19.9 mmol, 2 eq.) and it was left to stir for 16 h. Upon completion, the flask was chilled to 0°C and a saturated solution of sodium sulfite (5 mL) was added dropwise to quench excess peroxides. The solution was acidified to pH 2 using 1 M HCl and extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The organic phases were combined, dried using MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to obtain a slightly yellow oil (2.33 g, quant.) and the product was isolated by flash chromatography (hexanes/EtOAc/formic acid, 98:1:1 to 95:4:1) and then coevaporated 5 times with toluene to remove

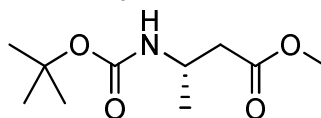
traces of formic acid to afford a slightly yellow oil (1.29 g, 56%). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 12.50-8.10 (1H, br s), 5.95 (0.3H, s), 4.67 (0.7H, s), 3.15-2.92 (2H, m), 2.51-2.27 (2H, m), 1.82-1.58 (2H, m), 1.45 (9H, s), 0.92 (3H, d, J = 6.7 Hz); **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** 178.8, 156.2, 79.3, 46.0, 33.2, 31.5, 28.8, 28.4, 17.1; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₁₁H₂₁NO₄: 254.1363, found: 254.1368.

(1S)-3-Diazo-1-methyl-2-oxopropylamino 2,2-dimethylpropionate (26)



Boc-L-Ala-OH (1.00 g, 5.29 mmol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous THF (21 mL, 0.25 M) and the solution was cooled to -15 °C. Isobutylchloroformate (564 μ L, 5.81 mmol, 1.1 eq.) was added, followed by triethylamine (420 μ L, 5.81 mmol, 1.1 eq.) After 15 minutes of stirring, it was removed from the cooling bath and left to warm up to room temperature. The resulting white mixture was filtered on a pad of Celite to obtain a colourless solution. To this solution was slowly added a freshly prepared solution of diazomethane in ether (30 mL, 0.88 M, 5 eq.) and the resulting yellow solution was left to stir for 2.5 h. Upon completion, the solution was quenched with acetic acid until colourless. It was then washed twice with sat. NaHCO₃ (2 x 60 mL), sat. NH₄Cl (2 x 60 mL) and brine (1 x 60 mL). The organic phase was dried using MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain a yellow oil (> 100%). This crude product was purified by flash chromatography (4:1 hexanes/ethyl acetate) to obtain a yellow crystalline solid (718 mg, 64%). **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 5.44 (1H, s), 5.12 (1H, s), 4.23 (1H, s), 1.45 (9H, s), 1.33 (3H, d, J = 7.0 Hz); **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ 194.4, 155.1, 80.0, 53.4, 28.3, 18.5; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₉H₁₅N₃O₃: 236.1006, found: 236.1010.

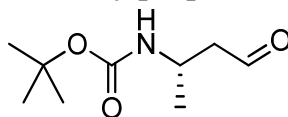
Methyl (3S)-3-(tert-butoxycarbonylamino)butyrate (27)



(1S)-3-Diazo-1-methyl-2-oxopropylamino 2,2-dimethylpropionate (718 mg, 3.37 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in anhydrous methanol (34 mL, 0.1 M). To this was added dropwise a solution of silver benzoate (78 mg, 0.34 mmol, 0.1 eq.) in triethylamine (3.4 mL, 0.1 M with respect to silver benzoate). After about 5 minutes, the solution turned black and was left to stir overnight. Upon completion, the solution was filtered on Celite and concentrated under reduced pressure to yield an orange oil which was solubilized in ethyl acetate (30 mL), washed with water (1 x 30 mL), 0.1 M HCl (1 x 30 mL) and

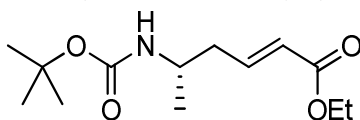
brine (1 x 30 mL), dried using MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain a black oil. This crude product was purified by flash chromatography (3:1 hexanes/ethyl acetate) to obtain a yellow solid (628 mg, 86%). **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 4.91 (1H, s), 4.03 (1H, m), 3.68 (3H, s), 2.50 (2H, m), 1.43 (9H, s), 1.21 (3H, d, *J* = 6.6 Hz); **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ 172.0, 155.0, 79.3, 51.6, 43.4, 40.6, 28.4, 20.4; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₁₀H₁₉NO₄: 240.1206, found: 240.1212.

(1*S*)-2-Formyl-1-methylethylamino 2,2-dimethylpropionate (28)



Methyl (3*S*)-3-(*tert*-butoxycarbonylamino)butyrate (1.53 g, 7.05 mmol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous dichloromethane (14 mL, 0.5 M) and chilled to -78 °C. To this was added a 1 M diisobutylaluminium hydride solution (12.0 mL, 12.0 mmol, 1.7 eq.) dropwise. Upon completion, the reaction mixture was transferred into a saturated solution of potassium sodium tartrate (50 mL) and the mixture was left to stir for 1 h. The two phases were separated and the aqueous phase was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The organic phases were combined, dried using MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain a yellow oil. The product was isolated by flash chromatography (DCM/MeOH, 99:1) to afford a slightly yellow oil (1.05 g, 86%). **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 9.76 (1H, t, *J* = 1.9 Hz), 4.69 (1H, s), 4.23-3.98 (1H, m), 2.70-2.47 (2H, m), 1.43 (9H, s), 1.24 (3H, d, *J* = 6.6 Hz); **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ 155.1, 79.6, 50.6, 42.3, 28.3, 21.0, aldehyde signal not observed; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₁₁H₂₁NO₄: 210.1101, found: 210.1104.

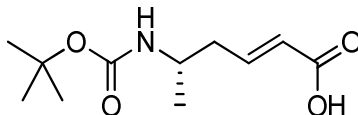
Ethyl (5*S,E*)-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)-2-hexenoate (29)



Triethyl 2-phosphonoacetate (1.41 mL, 7.05 mmol, 1.1 eq.) was dissolved in anhydrous THF (8 mL, 0.8 M), sodium hydride (200 mg, 8.33 mmol, 1.3 eq.) was added and the mixture was left to stir for 1 h. In a separate vessel, (1*S*)-2-Formyl-1-methylethylamino 2,2-dimethylpropionate (1.11 g, 6.41 mmol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous THF (3.2 mL, 2 M). This solution was then added dropwise to the first solution and left to stir for 1 h. Upon completion, water (10 mL) was added and the product was extracted with dichloromethane (5 x 20 mL). The organic phases were combined, dried using MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain a slightly yellow oil. This crude product was purified by flash chromatography (hexanes/ethyl acetate, 17:3) to afford a colourless oil (1.11 g, 68%).

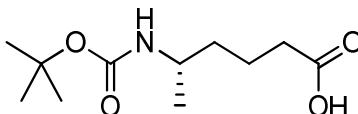
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.90 (1H, dt, J = 15.6, 7.5 Hz), 5.86 (1H, dt, J = 15.6, 1.3 Hz), 4.41 (1H, s), 4.18 (2H, q, J = 7.1 Hz), 3.81 (1H, s), 2.40-2.30 (2H, m), 1.43 (9H, s), 1.28 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.14 (3H, d, J = 6.6 Hz); **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ 166.2, 155.1, 144.6, 124.0, 79.3, 60.3, 45.6, 39.5, 28.3, 20.6, 14.2; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₁₃H₂₃NO₄: 280.1519, found: 280.1525.

(5*S*,*E*)-5-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-2-hexenoic acid (30)



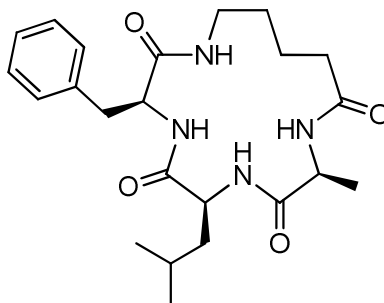
Ethyl (5*S*,*E*)-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)-2-hexenoate (989 mg, 3.84 mmol, 1 eq.) was dissolved in a 1:1 mixture of water and methanol (40 mL, 0.1 M), sodium hydroxide (768 mg, 19.2 mmol, 5 eq.) was added and the solution was stirred for 2 h. Upon completion, the methanol was largely removed under reduced pressure and 1 M HCl (20 mL) was added to pH 2. The product was extracted with dichloromethane (3 x 40 mL). The organic phases were combined, dried using MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain a white solid (807 mg, 92%) that was used without further purification. **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 9.77 (1H, br s), 7.01 (1H, dt, J = 15.6, 7.5 Hz), 5.87 (1H, dt, J = 15.6, 1.3 Hz), 4.48 (1H, s), 3.84 (1H, s), 2.45-2.30 (2H, m), 1.44 (9H, s), 1.16 (3H, d, J = 6.6 Hz); **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₁₁H₁₉NO₄: 252.1206, found: 252.1212.

(5*S*)-5-(*tert*-Butoxycarbonylamino)hexanoic acid (31)



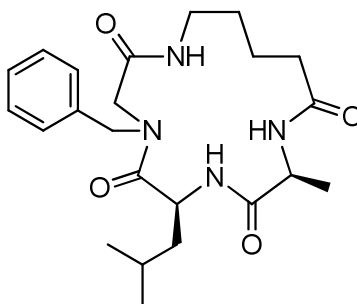
(5*S*,*E*)-5-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-2-hexenoic acid (807 mg, 3.52 mmol, 1 eq.) was dissolved in methanol (35 mL, 0.1 M), palladium on carbon (10% wt) was added (15 mg) and the solution was put under hydrogen atmosphere and shaken for 16 h. Upon completion, the reaction mixture was filtered through a pad of Celite and concentrated under reduced pressure to afford a colourless oil (796 mg, 98%). **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ 5.56 (0.3H, s), 4.39 (0.7H, s), 3.66 (1H, s), 2.37 (2H, td, J = 7.4, 2.0 Hz), 1.81-1.57 (3H, m), 1.50-1.41 (3H, m), 1.45 (9H, s), 1.13 (3H, d, J = 6.6 Hz); **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ 178.5, 155.4, 79.2, 53.4, 46.1, 36.5, 33.6, 28.4, 21.2; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₁₁H₂₁NO₄: 254.1363, found: 254.1369.

(3*S*,6*S*,9*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Ø-Ø)
(32)



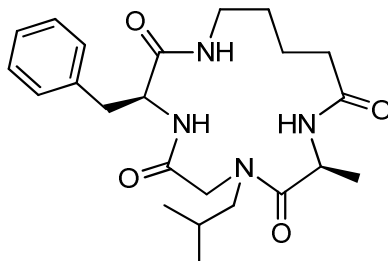
¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.32-7.16 (5H, m), 4.46 (1H, dd, J = 11.5, 4.2 Hz), 4.04-3.89 (2H, m), 3.53-3.38 (2H, m), 3.07 (1H, dd, J = 14.4, 11.3 Hz), 3.02-2.93 (1H, m), 2.30-2.20 (1H, m), 2.12-2.03 (1H, m), 1.79-1.66 (3H, m), 1.66-1.58 (3H, m), 1.58-1.49 (3H, m), 1.47 (3H, d, J = 7.2 Hz), 1.40-1.30 (1H, m), 0.87 (3H, d, J = 6.3 Hz), 0.82 (3H, d, J = 6.5 Hz); **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 176.6, 176.5, 174.5, 173.5, 139.6, 130.3, 129.6, 127.7, 56.8, 55.5, 52.3, 40.8, 39.7, 37.7, 36.1, 28.1, 26.1, 23.3, 22.9, 22.1, 16.5; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 453.2472, found: 453.2473.

(6*S*,9*S*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nphe-Ø)
(33)



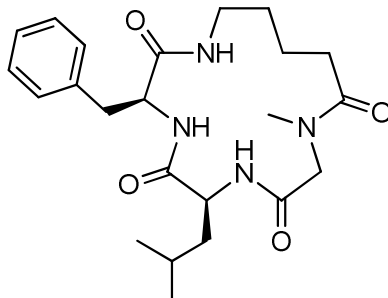
¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.33-7.15 (5H, m), 4.79-4.72 (1H, q, J = 7 Hz), 4.50-4.42 (1H, m), 4.28 (1H, d, J = 14.2 Hz), 3.59-3.52 (1H, m), 3.28-3.12 (3H, m), 2.94-2.85 (1H, dd, J = 13.6, 10.1 Hz), 2.29-2.19 (1H, m), 2.11-2.03 (1H, m), 1.99-1.87 (1H, m), 1.83-1.70 (1H, m), 1.67-1.54 (2H, m), 1.53-1.41 (2H, m), 1.32 (3H, d, J = 7 Hz), 0.98 (3H, d, J = 6.7 Hz), 0.92 (3H, d, J = 6.8 Hz), 0.85-0.77 (1H, m); **¹³C NMR (400 MHz, MeOD):** δ 174.8, 172.6, 170.8, 169.1, 138.6, 129.1, 128.9, 128.2, 126.3, 126.2, 56.1, 55.2, 51.3, 44.3, 37.6, 36.2, 34.1, 27.4, 27.1, 25.5, 23.0, 20.0, 19.9, 19.8, 19.7, 17.2; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 453.2472, found: 453.2465.

(3S,9S)-3-Benzyl-7-isobutyl-9-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nleu-Ø)
(34)



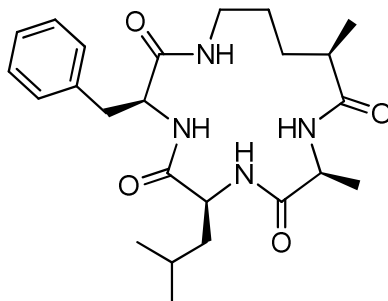
¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ 7.36-7.19 (5H, m), 4.74-4.66 (1H, m), 4.44-4.35 (1H, m), 4.07-3.97 (1H, m), 3.66-3.57 (1H, d, J = 15.0 Hz), 3.56-3.39 (2H, m), 3.16-3.01 (1H, m), 3.01-2.88 (2H, m), 2.83-2.70 (1H, m), 2.25-2.12 (1H, m), 2.05-1.35 (5H, m), 1.35-1.15 (3H, m), 0.89 (3H, d, J = 6.6 Hz), 0.83 (3H, d, J = 6.6 Hz); **¹³C NMR (75 MHz, MeOD):** δ 177.2, 174.7, 174.2, 173.7, 139.2, 130.4, 130.2, 129.7, 129.6, 127.8, 56.0, 55.0, 54.7, 40.9, 40.0, 39.6, 38.9, 35.7, 32.1, 27.9, 25.9, 23.4, 22.9, 22.7, 22.5, 21.6; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 453.2472, found: 453.2470.

(3S,6S)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nala-Ø)
(35)



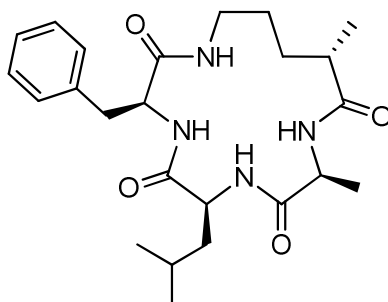
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.15 (1H, d, J = 6.3 Hz), 7.97 (1H, d, J = 8.5 Hz), 7.43-7.35 (2H, m), 7.33-7.26 (1H, m), 7.22-7.15 (2H, m), 6.97 (1H, t, J = 5.3 Hz), 5.00 (1H, d, J = 17.1 Hz), 4.54-4.45 (1H, m), 4.45-4.34 (2H, m), 4.10-4.01 (1H, m), 3.23 (1H, d, J = 15.7 Hz), 3.20-2.98 (2H, m), 2.28-2.19 (1H, m), 2.03-1.88 (1H, m), 1.69-1.54 (1H, m), 1.54-1.42 (4H, m), 1.42-1.30 (2H, m), 1.22 (3H, d, J = 7.3 Hz), 0.69 (3H, d, J = 6.3 Hz), 0.67 (3H, d, J = 6.2 Hz); **¹³C NMR (MHz,):** δ 172.1, 167.5, 137.4, 128.8, 127.4, 126.6, 51.6, 51.0, 50.4, 47.0, 40.7, 40.4, 37.6, 34.2, 27.4, 23.9, 22.9, 22.4, 21.9, 17.0; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 453.2472, found: 453.2468.

(3*S*,6*S*,9*S*,12*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,12-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron
ne (Ø-2*R*) (36)



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.70 (1H, d, J = 7.5 Hz), 8.24 (1H, s), 8.02 (1H, s), 7.32-7.13 (5H, m), 6.72 (1H, d, J = 6.7 Hz), 6.59 (1H, d, J = 7.9 Hz), 4.41-4.31 (1H, m), 4.96-4.84 (2H, m), 2.95-2.72 (2H, m), 2.23-2.11 (1H, m), 1.69-1.56 (1H, m), 1.54-1.43 (2H, m), 1.40 (3H, d, J = 7.0 Hz), 1.37-1.10 (5H, m), 1.00 (3H, d, J = 6.8 Hz), 0.81 (3H, d, J = 6.5 Hz); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 176.0, 173.8, 171.6, 170.7, 138.5, 128.9, 128.1, 126.1, 53.9, 49.9, 40.8, 37.7, 36.7, 30.1, 25.9, 24.2, 22.6, 21.4, 18.3, 16.8; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2638.

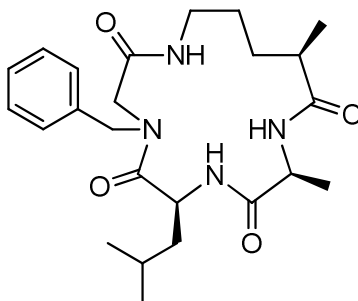
(3*S*,6*S*,9*S*,12*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,12-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron
e (Ø-2*S*) (37)



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.13 (1H, d, J = 8.0 Hz, H_N Phe), 7.91 (1H, d, J = 7.9 Hz, H_N Ala), 7.81 (1H, d, J = 8.4 Hz, H_N Leu), 7.50-7.43 (1H, m, H_N Linker), 7.30-7.13 (5H, m), 4.23-4.10 (2H, m, H_α Phe and H_α Ala), 4.03 (1H, td, J = 8.4, 6.3 Hz, H_α Leu), 3.27-3.18 (1H, m, H₅ Linker), 3.17-3.07 (1H, m, H_β Phe), 2.90 (1H, dd, J = 13.8, 9.1 Hz, H_β Phe), 2.39-2.29 (1H, m, H₂ Linker), 1.49-1.38 (3H, m, H_β Leu and H₄ Linker), 1.37-1.28 (4H, m, H_β Leu, H_γ Leu and H₃ Linker), 1.23 (3H, d, J = 7.3 Hz, H_β Ala), 0.95 (3H, d, J = 6.8 Hz, H_{Me} Linker), 0.81 (3H, d, J = 6.3 Hz, H_δ Leu), 0.78 (3H, d, J = 6.2 Hz, H_δ Leu); **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 7.59 (1H, br s, H_N Phe), 7.34-7.16 (5H, m), 6.57 (1H, s, H_N Leu), 6.39 (2H, s, H_N Ala and H_N Linker), 4.79-4.57 (1H, m, H_α Phe), 4.22-4.08 (1H, m, H_α Ala), 3.90 (1H, br s, H_α Leu), 3.67-3.52 (1H, m, H₅ Linker), 3.46 (1H, dd, J = 14.0, 5.0 Hz, H_β Phe), 3.04-2.94 (1H, m, H_β Phe), 2.93-2.86 (1H, br s, H₅ Linker), 2.48-2.36 (1H, m, H₂ Linker), 1.57-1.51 (3H, m, H_β

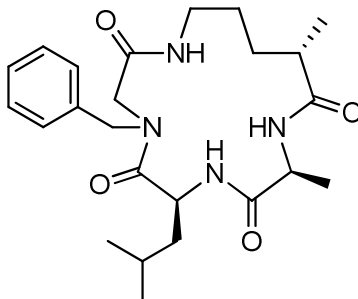
Leu and H₃ Linker), 1.49 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H_β Ala), 1.45-1.35 (1H, m, H_γ Leu), 1.32-1.21 (1H, m), 1.13 (3H, d, $J = 4.6$ Hz, H_{Me} Linker), 0.86 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H_δ Leu), 0.80 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H_δ Leu); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆)**: δ 175.3, 172.7, 171.1, 170.3, 138.3, 129.0, 128.1, 126.2, 55.1, 52.9, 49.5, 41.1, 38.1, 37.7, 36.2, 30.6, 25.0, 24.2, 22.4, 22.2, 17.7, 15.3; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2640.

(6*S*,9*S*,12*R*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,12-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nphe-2*R*) (38)



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.37 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.27 (1H, d, $J = 5.3$ Hz), 7.43-7.34 (2H, m), 7.34-7.26 (1H, m), 7.22-7.13 (2H, m), 7.03-6.95 (1H, m), 5.07 (1H, d, $J = 17.1$ Hz), 4.46-4.28 (2H, m), 4.28-4.19 (1H, m), 4.05-3.94 (1H, m), 3.16 (1H, d, $J = 16.2$ Hz), 3.04-2.82 (2H, m), 2.20-2.10 (1H, m), 2.06-1.95 (1H, m), 1.82-1.68 (1H, m), 1.68-1.54 (1H, m), 1.54-1.37 (3H, m), 1.22 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 0.87 (3H, d, $J = 6.7$ Hz), 0.73 (3H, d, $J = 2.7$ Hz), 0.72 (3H, d, $J = 2.6$ Hz); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆)**: δ 174.2, 173.1, 171.5, 167.6, 137.4, 128.8, 127.4, 126.7, 51.3, 50.7, 50.4, 47.8, 44.1, 40.2, 31.7, 31.4, 29.5, 24.0, 22.9, 21.9, 18.1, 16.6; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2624.

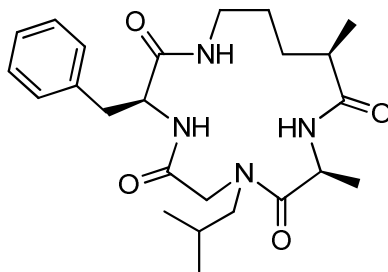
(6*S*,9*S*,12*S*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,12-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nphe-2*S*) (39)



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.77 (1H, d, $J = 6.2$ Hz, H_N Leu), 8.06 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H_N Ala), 7.46-7.12 (5H, m), 6.89 (1H, s, H_N Linker), 5.32 (1H, br s), 5.18 (1H, d, $J = 15$ Hz), 4.68-4.57 (1H, m,

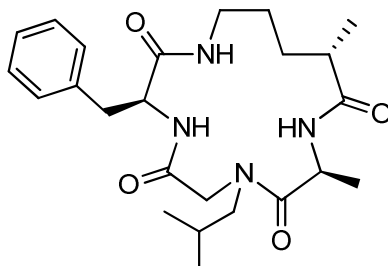
H_α Phe), 4.56-4.47 (1H, m, H_α Ala), 4.40-4.21 (1H, m, H_α Leu), 3.77 (1H, d, *J* = 15.0 Hz, H_β Phe), 3.21-3.09 (1H, m, H₅ Linker), 3.00-2.90 (1H, m, H₅ Linker), 2.69-2.68 (m, 1H), 2.48-2.38 (1H, m, H₂ Linker), 2.35-2.30 (1H, dt, 3.7, 1.8 Hz), 1.70-1.58 (1H, m, H₄ Linker), 1.58-1.48 (1H, m, H_β Leu), 1.48-1.39 (1H, m, H_γ Leu), 1.33-1.21 (3H, m, H₃ Linker), 1.17 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H_β Ala), 1.14-1.07 (1H, m, H₄ Linker), 0.93 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H_{Me} Linker), 0.91-0.83 (2H, m), 0.66 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, H_δ Leu), 0.41 (3H, d, *J* = 4.3 Hz, H_δ Leu); **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 7.41-7.17 (5H, m), 6.98 (1H, br s, H_N Leu), 6.57-6.47 (1H, m, H_N Linker), 5.87 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H_N Ala), 5.34 (1H, d, *J* = 17.1 Hz, H_β Phe), 4.81-4.73 (1H, m, H_α Leu), 4.70 (1H, d, *J* = 14.9 Hz, H_α Nphe), 4.57-4.54 (1H, m, H_α Ala), 4.50 (1H, d, *J* = 17.1 Hz, H_β Nphe), 3.51-3.41 (1H, m, H₅ Linker), 3.34 (1H, d, *J* = 14.9 Hz, H_α Nphe), 3.08-2.95 (1H, m, H₅ Linker), 2.27-2.12 (1H, m, H₂ Linker), 1.64-1.57 (2H, m, H₃ Linker), 1.54-1.40 (3H, m, H₄ Linker and H_γ Leu), 1.36 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H_β Ala), 1.15 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H_{Me} Linker), 0.76 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H_δ Leu), 0.59 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H_δ Leu); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 174.9, 168.0, 138.0, 128.8, 128.5, 127.6, 127.3, 126.5, 52.5, 38.6, 37.5, 31.6, 25.8, 23.7, 23.1, 22.9, 22.0, 20.9, 19.7, 18.1, 17.2, 15.1; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2622.

(3*S*,9*S*,12*R*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,12-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Nleu-2R) (40)



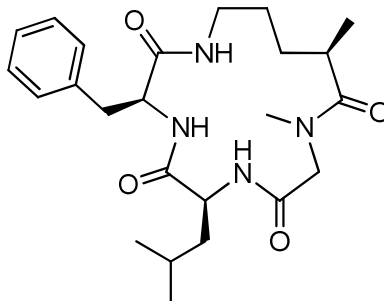
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.79 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 8.41 (1H, s), 8.31 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 8.21 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 7.78-7.68 (1H, d, *J* = 7.9 Hz), 7.48-7.39 (1H, m), 7.32-7.14 (10H, m), 4.69-4.55 (2H, m), 4.48-4.38 (1H, m), 4.32-4.23 (2H, m), 4.20-4.09 (1H, d, *J* = 18.3 Hz), 3.20-3.11 (2H, m), 3.10-3.01 (2H, m), 3.00-2.81 (2H, m), 2.80-2.69 (2H, m), 2.27-2.03 (3H, m), 1.95-1.82 (1H, m), 1.79-1.52 (4H, m), 1.47-1.28 (3H, m), 1.21 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.17 (3H, d, *J* = 6.7 Hz), 1.08 (3H, d, *J* = 7.2 Hz), 0.93 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 0.89 (3H, d, *J* = 6.7 Hz), 0.82 (3H, d, *J* = 6.7 Hz), 0.75 (3H, d, *J* = 6.7 Hz), 0.68 (3H, d, *J* = 6.7 Hz); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 176.2, 175.6, 174.02, 170.4, 169.1, 167.9, 138.7, 138.3, 129.2, 129.0, 128.2, 128.1, 126.2, 55.5, 55.0, 54.9, 53.8, 50.7, 44.6, 42.0, 38.4, 36.2, 31.6, 30.8, 27.2, 26.5, 25.8, 20.1, 19.9, 19.7, 17.2, 16.7, 16.4; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for

(3*S*,9*S*,12*S*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,12-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrona (Nleu-2*S*) (41)



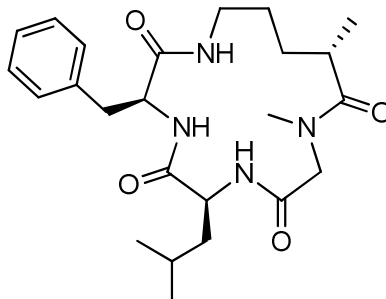
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.36 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H_N Phe), 7.99 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H_N Ala), 7.46-7.36 (1H, m, H_N Linker), 7.30-7.15 (5H, m), 4.72-4.65 (1H, m, H_α Ala), 4.25-4.19 (1H, m, H_α Phe), 4.16 (1H, d, *J* = 14.0 Hz, H_α Nleu), 3.48-3.39 (1H, m, H_β Nleu), 3.29-3.24 (1H, m, H_α Nleu), 3.19-3.11 (1H, m, H_β Phe), 3.11-3.08 (1H, m, H_β Nleu), 3.07-2.96 (2H, m, H₅ Linker), 2.75 (1H, dd, *J* = 14.3, 10.9 Hz, H_β Phe), 2.34-2.31 (1H, m, H₂ Linker), 1.93-1.85 (1H, m, H_γ Nleu), 1.71-1.61 (2H, m, H₄ Linker), 1.25-1.22 (2H, m, H₃ Linker), 1.20 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H_β Ala), 0.91 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H_{Me} Linker), 0.90 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, H_δ Nleu), 0.84 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H_α Nleu); **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 7.34-7.19 (5H, m), 7.25 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H_N Phe), 6.39 (1H, d, *J* = 8.9 Hz, H_N Ala), 5.70 (1H, br s, H_N Linker), 5.05-4.95 (1H, m, H_α Ala), 4.67 (1H, dd, *J* = 13.5, 0.9 Hz, H_α Nleu), 4.50 (1H, dt, *J* = 9.2, 7.5 Hz, H_α Phe), 3.61-3.49 (1H, m, H₅ Linker), 3.44 (1H, dd, *J* = 14.4, 8.0 Hz, H_β Nleu), 3.15 (1H, d, *J* = 13.7 Hz, H_α Nleu), 3.09-3.05 (2H, m, H_β Phe), 3.03-2.94 (1H, m, H_β Nleu), 2.84-2.75 (1H, m, H₅ Linker), 2.47-2.38 (1H, m, H₂ Linker), 1.96-1.85 (1H, m, H_γ Nleu), 1.59-1.51 (2H, m, H₄ Linker), 1.35 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H_β Ala), 1.33-1.25 (3H, m, H₃ Linker), 1.08 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H_{Me} Linker), 0.95 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H_δ Nleu), 0.92 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H_δ Nleu); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆):** δ 175.4, 175.0, 171.0, 169.4, 138.7, 129.1, 128.9, 128.3, 128.2, 126.3, 56.3, 55.5, 51.4, 44.2, 37.8, 36.2, 32.0, 27.5, 26.0, 20.0, 19.9, 19.8, 17.4, 17.2; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2626.

(3*S*,6*S*,12*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-12-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanete trone (Nala-2*R*) (42)



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.84 (1H, d, *J* = 5.5 Hz), 7.37 (1H, d, *J* = 9.4 Hz), 7.32-7.13 (5H, m), 6.36 (1H, d, *J* = 9.4 Hz), 4.46-4.35 (1H, m), 4.28 (1H, d, *J* = 15.0 Hz), 3.83-3.73 (1H, m), 3.60 (1H, d, *J* = 15.0 Hz), 3.21 (3H, s), 2.95-2.86 (1H, m), 2.86-2.79 (1H, m), 2.71-2.62 (1H, m), 1.82-1.68 (1H, m), 1.65-1.53 (1H, m), 1.48-1.36 (1H, m), 1.32-1.05 (4H, m), 0.97 (3H, d, *J* = 6.7 Hz), 0.80 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 0.74 (3H, 6.5 Hz); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 178.1, 172.8, 171.9, 171.1, 138.8, 129.2, 128.7, 126.7, 54.1, 53.5, 40.6, 40.4, 40.2, 39.7, 39.5, 39.3, 39.2, 25.0, 24.5, 23.3, 21.3, 18.8; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2626.

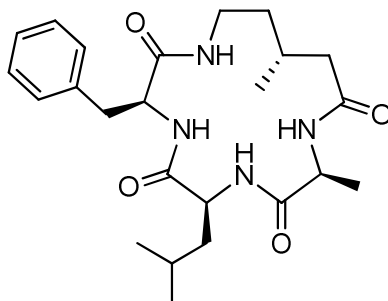
(3*S*,6*S*,12*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-12-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanete trone (Nala-2*S*) (43)



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.29 (1H, d, *J* = 4.3 Hz, H_N Leu), 8.06 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H_N Phe), 7.32-7.11 (5H, m), 6.87 (1H, dd, *J* = 6.7, 2.2 Hz, H_N Linker), 4.49 (1H, d, *J* = 17.8 Hz, H_α Nala), 4.34 (1H, ddd, *J* = 11.2, 8.8, 4.1 Hz, H_α Phe), 3.81 (1H, d, *J* = 17.7 Hz, H_α Nala), 3.82-3.75 (1H, m, H_α Leu), 3.29-3.23 (2H, m, H_β Phe and H₅ Linker), 2.84 (1H, dd, *J* = 14.1, 11.4 Hz), 2.83-2.78 (1H, m, H₅ Linker), 2.72 (3H, s, H_{Me} Linker), 2.69-2.65 (1H, m, H₂ Linker), 1.62-1.50 (1H, m, H₃ Linker), 1.47-1.38 (2H, m, H₄ Linker), 1.36-1.22 (2H, m, H_β Leu and H₇ Leu), 1.21-1.06 (2H, m, H_β Leu and H₃ Linker), 0.96 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H_{Me} Linker), 0.79 (3H, d, *J* = 6.2 Hz, H_δ Leu), 0.71 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, H_δ Leu); **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 7.42 (1H, br s, H_N Phe), 7.35-7.13 (1H, br s, N_H Linker and N_H Leu), 4.65 (1H, br s, H_α Phe), 4.13-3.98 (1H, m), 3.86 (1H, br s, H_α Leu), 3.62-3.48 (2H, m, H₅

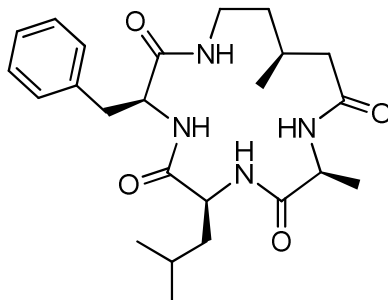
Linker), 3.47-3.38 (1H, m, H_β Phe), 3.18 (3H, s, H_β Nala), 3.13-3.04 (2H, m, H₅ Linker and H_β Phe), 2.93 (2H, s), 2.89-2.78 (1H, m, H₂ Linker), 1.80-1.66 (2H, br s, H₃ Linker), 1.54-1.45 (1H, br s, H_γ Leu), 1.16 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H_{Me} Linker), 0.95-0.78 (6H, m, H_δ Leu); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 175.9, 171.8, 170.8, 169.9, 138.6, 128.9, 128.0, 126.0, 54.0, 53.9, 51.2, 35.9, 34.8, 34.4, 30.3, 23.8, 22.2, 17.1; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2632.

(3*S*,6*S*,9*S*,13*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,13-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron
ne (Ø-3*R*) (44)



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.22-8.06 (3H, m), 7.54 (1H, t, $J = 5.3$ Hz), 7.29-7.11 (5H, m), 4.20-4.12 (1H, m), 3.95-3.86 (1H, m), 3.28-3.18 (1H, m), 3.13 (1H, dd, $J = 13.8, 5.2$ Hz), 2.99-2.88 (2H, m), 2.14-2.04 (1H, m), 1.92-1.83 (1H, m), 1.74-1.61 (1H, m), 1.53-1.23 (5H, m), 1.21 (3H, d, $J = 7.3$ Hz), 0.89 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 0.82-0.73 (6H, m); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 172.9, 172.3, 171.2, 170.4, 138.5, 129.0, 128.1, 126.1, 55.3, 53.1, 49.9, 42.4, 40.4, 40.0, 36.4, 36.0, 35.6, 28.5, 24.3, 22.5, 22.2, 20.9, 17.2; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2639.

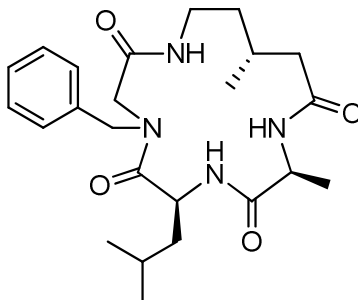
(3*S*,6*S*,9*S*,13*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,13-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron
e (Ø-3*S*) (45)



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.52 (1H, d, $J = 7$ Hz), 8.17-8.05 (1H, m), 8.05-7.93 (1H, m), 7.30-7.13 (5H, m), 6.90-6.80 (1H, m), 4.39-4.30 (1H, m), 4.08-3.91 (2H, m), 3.27 (1H, dd, $J = 13.9, 4.5$ Hz), 2.87-2.75 (2H, m), 2.21 (1H, d, $J = 10.8$ Hz), 1.89-1.63 (3H, m), 1.49-1.38 (1H, m), 1.38-1.34 (1H, m), 1.32 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 1.26-1.15 (1H, m), 1.15-1.03 (1H, m), 0.93 (3H, d, $J = 6.2$ Hz), 0.80

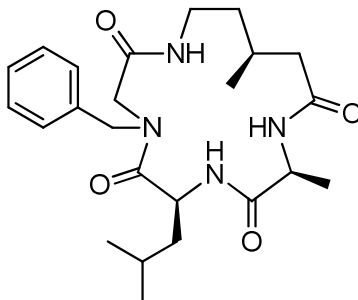
(3H, d, $J = 6.5$ Hz), 0.73 (3H, d, $J = 6.3$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 173.2, 172.1, 171.5, 170.2, 138.4, 128.9, 128.1, 126.1, 53.9, 53.2, 50.0, 43.4, 36.5, 35.8, 34.8, 27.4, 24.2, 22.5, 21.7, 21.0, 17.2; HRMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_4$: 467.2629, found: 467.2644.

(6*S*,9*S*,13*R*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,13-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nphe-3*R*) (46)



^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.24 (1H, d, $J = 6.2$ Hz), 7.65 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.42-7.34 (2H, m), 7.33-7.26 (1H, m), 7.23-7.12 (2H, m), 7.01-6.91 (1H, m), 6.55 (3H, br s), 4.99 (1H, d, $J = 17.3$ Hz), 4.80-4.70 (1H, m), 4.46 (1H, d, $J = 17.1$ Hz), 4.34 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 4.06-3.96 (1H, m), 3.30-3.19 (1H, m), 3.13-3.02 (1H, m), 2.23 (1H, d, $J = 12.5$ Hz), 1.85-1.75 (2H, m), 1.74-1.62 (1H, m), 1.51-1.40 (1H, m), 1.40-1.15 (2H, m), 1.23 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 0.93 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), 0.65 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), 0.60 (3H, d, $J = 6.5$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 172.8, 172.6, 172.5, 167.3, 137.5, 128.8, 127.4, 126.4, 51.7, 51.5, 50.6, 45.9, 42.3, 40.9, 40.4, 36.1, 34.7, 28.0, 23.9, 23.9, 22.9, 21.8, 21.6, 17.1; HRMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_4$: 467.2629, found: 467.2622.

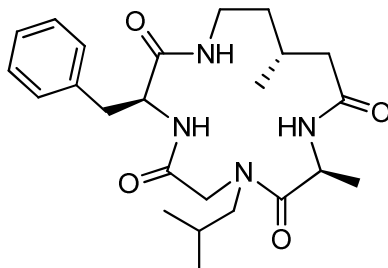
(6*S*,9*S*,13*S*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,13-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nphe-3*S*) (47)



^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.69 (1H, s), 8.10 (1H, s), 7.46-7.06 (5H, m), 6.87 (1H, s), 6.66 (1H, s), 5.34 (1H, s), 4.68-4.44 (1H, m), 4.44-4.14 (2H, m), 2.93 (2H, s), 2.14-1.64 (3H, m), 1.63-1.35 (3H, m), 1.21-1.00 (3H, m), 0.90 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 0.65 (2H, s), 0.36 (2H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 175.1, 173.5, 172.0, 168.0, 138.0, 128.7, 127.3, 126.4, 51.9, 47.5, 42.1, 38.6, 35.8, 33.6,

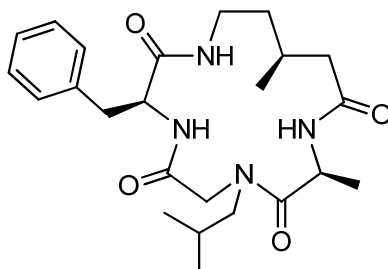
29.6, 29.3, 24.2, 23.7, 23.0, 22.1, 20.8, 18.4, 17.5; **HRMS** $[M+Na]^+$ calcd for $C_{23}H_{34}N_4O_4$: 467.2629, found: 467.2621.

(3*S*,9*S*,13*R*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,13-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nleu-3*R*) (48)



1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.23 (1H, d, J = 8.5 Hz), 8.05 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.51-7.41 (1H, m), 7.30-7.12 (6H, m), 4.64-4.52 (1H, m), 4.32-4.22 (1H, m), 4.18 (1H, d, J = 14.0 Hz), 3.22 (1H, d, J = 14.0 Hz), 3.20-3.11 (2H, m), 3.10-2.97 (2H, m), 2.76 (1H, dd, J = 14.5, 10.7 Hz), 2.10 (1H, dd, J = 12.2, 9.6 Hz), 1.93-1.73 (3H, m), 1.63-1.50 (1H, m), 1.19 (3H, d, J = 6.8 Hz), 1.14-1.02 (1H, m), 0.92-0.85 (6H, m), 0.82 (3H, d, J = 6.7 Hz); **^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6):** δ 174.8, 172.0, 171.0, 169.0, 138.6, 128.9, 128.24, 128.19, 126.2, 56.1, 55.1, 51.3, 44.6, 42.3, 36.3, 35.9, 34.1, 29.0, 27.3, 20.6, 19.8, 19.7, 17.1; **HRMS** $[M+Na]^+$ calcd for $C_{23}H_{34}N_4O_4$: 467.2629, found: 467.2626.

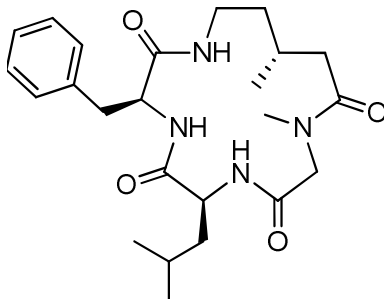
(3*S*,9*S*,13*S*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,13-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nleu-3*S*) (49)



1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.36-8.25 (1H, m), 8.21-8.14 (1H, m), 8.08-7.96 (1H, m), 7.66-7.57 (1H, m), 7.36-7.29 (1H, m), 7.29-7.12 (6H, m), 4.75-4.57 (1H, m), 4.46-4.30 (1H, m), 4.27-4.16 (1H, m), 3.65-3.53 (1H, m), 3.28-3.17 (3H, m), 3.17-3.05 (2H, m), 3.03-2.86 (2H, m), 2.82-2.69 (1H, m), 2.39-2.27 (1H, m), 2.16-2.02 (1H, m), 2.00-1.55 (5H, m), 1.31-1.15 (2H, m), 1.16 (3H, dd, J = 18.9, 6.8 Hz), 0.97-0.87 (6H, m), 0.71 (3H, dd, J = 26.0, 6.7 Hz); **^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6):** δ 175.1, 172.9, 172.4, 172.1, 170.7, 170.5, 169.9, 168.5, 139.2, 129.5, 129.4, 128.6, 128.5, 126.7, 126.6, 56.4, 55.8, 55.3, 53.4, 51.8, 51.6, 44.8, 44.6, 43.0, 42.2, 40.6, 40.4, 40.2, 39.9, 39.7, 39.5, 39.3, 37.7, 37.1,

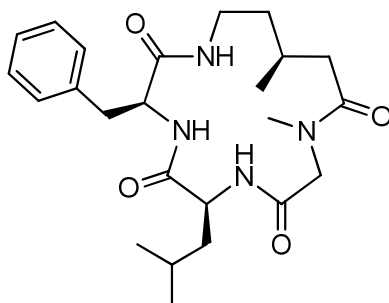
36.7, 35.7, 35.1, 30.0, 29.1, 27.7, 26.2, 22.1, 21.7, 20.6, 20.30, 20.25, 20.2, 18.1, 17.9; **HRMS** $[M+Na]^+$ calcd for $C_{23}H_{34}N_4O_4$: 467.2629, found: 467.2630.

(3*S*,6*S*,13*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-13-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanete trone (Nala-3*R*) (50)



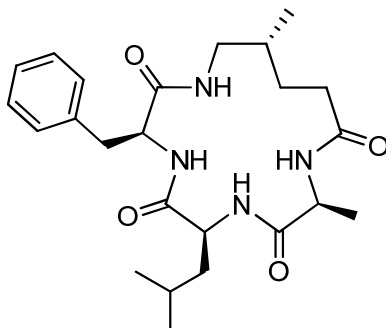
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.44 (1H, s), 8.32-8.15 (1H, m), 7.61 (1H, s), 7.31-7.06 (5H, m), 4.51-4.35 (2H, m), 3.97-3.86 (1H, m), 3.81 (1H, d, J = 18.1 Hz), 3.22-3.11 (1H, m), 3.11-2.93 (2H, m), 2.75 (3H, s), 2.39 (1H, d, J = 12.5 Hz), 1.92-1.71 (2H, m), 1.63-1.44 (1H, m), 1.41-1.19 (3H, m), 1.19-1.06 (1H, m), 0.80 (3H, d, J = 6.3 Hz), 0.77 (3H, d, J = 6.0 Hz), 0.71 (3H, 6.3 Hz); **HRMS** $[M+Na]^+$ calcd for $C_{23}H_{34}N_4O_4$: 467.2629, found: 467.2626.

(3*S*,6*S*,13*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-13-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanete trone (Nala-3*S*) (51)



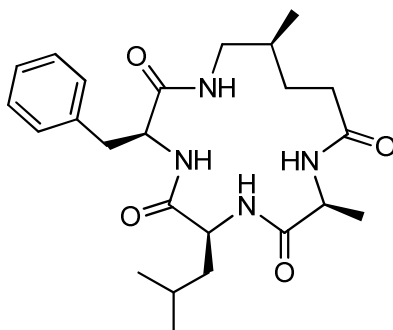
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.85 (1H, d, J = 5.5 Hz), 8.51-8.35 (1H, m), 7.31-7.11 (9H, m), 6.50-6.40 (1H, m), 4.50-4.18 (3H, m), 4.00-3.89 (1H, m), 3.82-3.73 (1H, m), 3.60 (1H, d, J = 15.0 Hz), 3.19 (3H, s), 2.75-2.66 (3H, m), 1.97-1.90 (1H, m), 1.84-1.66 (2H, m), 1.63-1.51 (1H, m), 1.45-1.33 (1H, m), 1.31-1.25 (1H, m), 1.22-1.16 (3H, m), 1.16-1.04 (1H, m), 0.98 (3H, d, J = 6.8 Hz), 0.83-0.70 (13H, m), 0.67 (2H, d, J = 6.3 Hz); **^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6):** δ 174.1, 172.2, 171.4, 170.5, 138.2, 133.7, 129.0, 128.7, 128.2, 128.0, 126.2, 53.5, 53.1, 53.0, 40.4, 38.5, 37.2, 36.7, 34.8, 34.1, 28.2, 24.0, 23.7, 22.8, 22.4, 22.1, 21.2, 20.9, 19.1; **HRMS** $[M+Na]^+$ calcd for $C_{23}H_{34}N_4O_4$: 467.2629, found: 467.2631.

(3*S*,6*S*,9*S*,14*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,14-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron
ne (Ø-4R) (52)



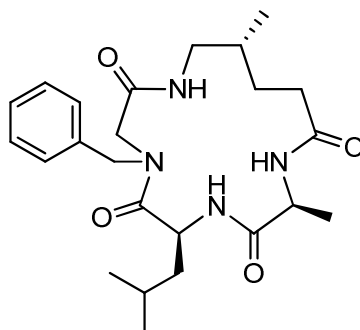
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.28-8.12 (3H, m), 7.70-7.60 (1H, m), 7.29-7.13 (5H, m), 4.36-4.24 (1H, m), 4.08-3.96 (2H, m), 3.21-3.08 (2H, m), 2.88 (1H, dd, *J* = 14.0, 9.1 Hz), 2.70-2.59 (1H, m), 2.13-2.00 (2H, m), 1.77-1.62 (1H, m), 1.51-1.36 (2H, m), 1.34-1.13 (3H, m), 1.21 (3H, d, *J* = 7.2 Hz), 0.86-0.77 (6H, m), 0.75 (3H, 6.2 Hz); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 173.7, 172.9, 171.2, 170.1, 138.2, 129.0, 128.1, 126.2, 55.0, 54.9, 53.1, 50.3, 44.6, 40.8, 36.6, 33.2, 32.8, 29.8, 24.3, 22.5, 22.0, 18.0, 17.2; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2641.

(3*S*,6*S*,9*S*,14*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,14-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron
e (Ø-4S) (53)



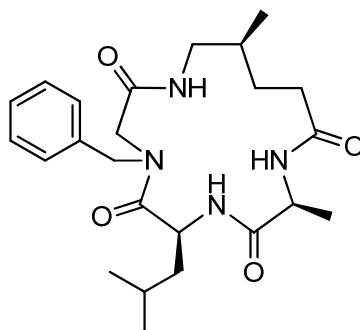
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.48 (1H, d, *J* = 6.7 Hz), 8.18 (1H, s), 8.05 (1H, s), 7.30-7.12 (7H, m), 4.41-4.30 (1H, m), 4.07-3.90 (2H, m), 3.27-3.17 (1H, m), 3.14-3.01 (1H, m), 2.86-2.68 (2H, m), 2.26-2.16 (1H, m), 1.75-1.63 (1H, m), 1.48-1.37 (1H, m), 1.31 (3H, d, *J* = 7.2 Hz), 1.27-1.17 (1H, m), 1.13-1.01 (1H, m), 0.85 (3H, d, *J* = 6.7 Hz), 0.79 (3H, d, *J* = 6.3 Hz), 0.73 (3H, d, *J* = 6.3 Hz); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 173.1, 173.0, 171.4, 170.3, 138.3, 128.9, 128.1, 126.1, 54.2, 53.3, 50.0, 44.1, 40.2, 36.8, 32.2, 31.8, 29.6, 24.2, 22.5, 21.8, 17.6, 17.1; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2613.

(6*S*,9*S*,14*R*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,14-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nphe-4*R*) (54)



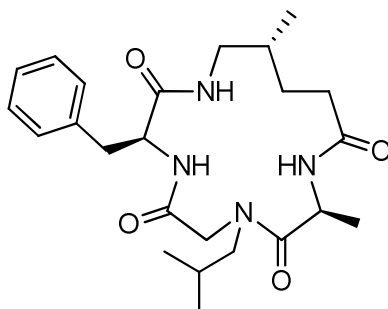
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.98 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.63 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.45-7.12 (7H, m), 6.86-6.75 (1H, m), 4.97 (1H, d, *J* = 17.1 Hz), 4.68-4.57 (1H, m), 4.55-4.36 (2H, m), 4.26-4.17 (1H, m), 3.18-3.07 (1H, m), 3.01-2.79 (2H, m), 2.22-2.10 (1H, m), 1.64-1.36 (6H, m), 1.33-1.10 (9H, m), 1.03-0.92 (1H, m), 0.90-0.75 (2H, m), 0.68 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 0.63 (3H, d, *J* = 6.3 Hz); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 175.0, 172.8, 172.5, 167.6, 137.3, 128.8, 127.5, 126.5, 51.8, 51.4, 49.9, 41.3, 40.8, 37.9, 32.1, 26.6, 23.9, 23.0, 21.7, 17.5, 16.8; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2623.

(6*S*,9*S*,14*S*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,14-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nphe-4*S*) (55)



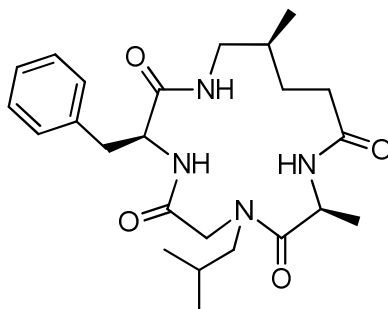
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.20 (1H, d, *J* = 6.2 Hz), 7.86 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.48-7.34 (2H, m), 7.34-7.24 (1H, m), 7.24-7.13 (2H, m), 7.12-7.01 (1H, m), 4.93 (1H, d, *J* = 17.1 Hz), 4.74-4.57 (1H, m), 4.51-4.32 (2H, m), 4.10-3.97 (1H, m), 3.27 (1H, d, *J* = 15.7 Hz), 3.12-2.98 (1H, m), 2.95-2.79 (1H, m), 2.37-2.21 (1H, m), 2.06-1.78 (2H, m), 1.65-1.26 (5H, m), 1.22 (3H, d, *J* = 7.3 Hz), 0.83 (3H, d, *J* = 6.7 Hz), 0.75-0.55 (6H, m); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 173.3, 172.8, 172.5, 167.5, 137.4, 128.8, 127.4, 126.5, 51.5, 51.0, 50.4, 46.4, 43.7, 40.7, 31.4, 30.9, 29.2, 24.0, 22.8, 22.0, 17.8, 17.1; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2621.

(3*S*,9*S*,14*R*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,14-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nleu-4*R*) (56)



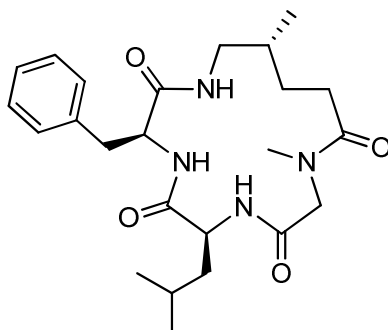
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.12-7.99 (2H, m), 7.44-7.34 (1H, m), 7.31-7.10 (6H, m), 4.53-4.43 (1H, m), 4.34-4.24 (1H, m), 4.18 (1H, d, J = 14.2 Hz), 3.24-3.12 (2H, m), 3.11-2.99 (1H, m), 2.99-2.76 (3H, m), 2.19-1.94 (2H, m), 1.93-1.72 (4H, m), 1.49-1.30 (2H, m), 1.19 (3H, d, J = 6.7 Hz), 1.12 (1H, d, J = 6.3 Hz), 1.09-1.00 (1H, m), 0.94-0.83 (7H, m), 0.81 (3H, d, J = 6.5 Hz), 0.77-0.64 (2H, m); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 174.8, 173.3, 170.6, 168.5, 138.6, 129.1, 128.9, 128.1, 126.1, 56.0, 54.9, 54.7, 51.5, 45.2, 45.0, 36.3, 33.0, 31.2, 30.7, 27.4, 19.9, 19.79, 19.75, 18.7, 16.6; **HRMS** $[M+Na]^+$ calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2620.

(3*S*,9*S*,14*S*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,14-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nleu-4*S*) (57)



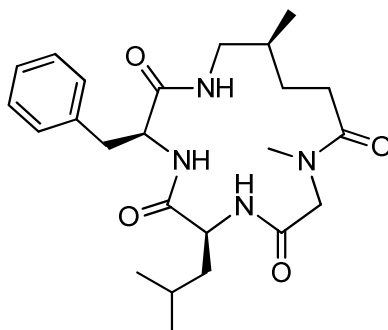
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.39 (1H, dd, J = 70.7, 6.42 Hz), 8.00 (1H, dd, J = 46.4, 8.4 Hz), 7.87 (1H, dt, J = 84.4, 5.5 Hz), 7.31-7.11 (5H, m), 4.68 (1H, dt, J = 51.1, 7.2 Hz), 4.25 (1H, dd, J = 120.0, 18 Hz), 4.35 (1H, m), 3.19-2.72 (6H, m), 2.07 (1H, dm, 181.8 Hz), 2.06-1.21 (6H, m), 1.14 (3H, dd, J = 28.1, 6.6 Hz), 0.90-0.75 (6H, m), 0.68 (3H, dd, J = 11.0, 6.7 Hz); **HRMS** $[M+Na]^+$ calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2622.

(3*S*,6*S*,14*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-14-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanete trone (Nala-4*R*) (58)



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.07 (1H, d, *J* = 6.5 Hz), 7.90 (1H, d, *J* = 8.9 Hz), 7.53-7.45 (1H, m), 7.27-7.10 (5H, m), 4.47-4.30 (2H, m), 3.97-3.89 (1H, m), 3.86 (1H, d, *J* = 18.1 Hz), 3.28-3.18 (1H, m), 3.15 (1H, s), 3.11-3.03 (1H, m), 2.75 (3H, s), 2.35-2.22 (1H, m), 2.13-2.03 (1H, m), 1.67-1.55 (1H, m), 1.55-1.43 (1H, m), 1.43-1.35 (1H, m), 1.35-1.25 (1H, m), 1.20-1.07 (2H, m), 0.88-0.78 (6H, m), 0.77-0.69 (3H, d, *J* = 6.5 Hz); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 173.4, 171.8, 170.7, 168.9, 138.0, 129.1, 128.8, 128.2, 128.0, 126.1, 54.1, 53.4, 52.1, 45.2, 40.1, 37.2, 34.7, 32.6, 32.1, 30.7, 24.1, 22.4, 21.9, 18.7; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2628.

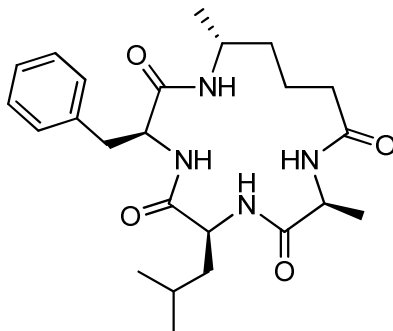
(3*S*,6*S*,14*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-14-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanete trone (Nala-4*S*) (59)



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.58 (1H, d, *J* = 5.5 Hz), 8.21 (1H, m), 7.98 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.14-6.88 (11H, m), 6.33 (1H, d, *J* = 9.1 Hz), 4.25-3.99 (3H, m), 3.71-3.61 (1H, m), 3.60-3.51 (1H, m), 3.37 (1H, d, *J* = 15.0 Hz), 3.23-3.14 (2H, m), 3.04-2.92 (2H, m), 2.97 (3H, s), 2.87-2.73 (1H, m), 2.56 (2H, d, *J* = 13.3 Hz), 2.33 (1H, d, *J* = 11.8 Hz), 2.27 (2H, s), 2.21-2.07 (1H, m), 1.98-1.86 (1H, m), 1.80-1.70 (1H, m), 1.53-1.21 (3H, m), 1.21-0.81 (6H, m), 0.73 (2H, d, *J* = 6.7 Hz), 0.66 (2H, d, *J* = 6.7 Hz), 0.56 (5H, 6.3 Hz), 0.53-0.43 (5H, m); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 174.9, 172.8, 172.1, 171.8, 171.4, 170.35, 170.31, 169.6, 138.4, 138.2, 129.05, 128.98, 128.7, 128.2, 128.00, 127.96, 126.2, 126.1, 53.9, 52.9, 52.1, 45.6, 44.5, 39.8, 39.04, 39.02, 37.2, 36.1, 34.4, 32.9, 30.7, 29.8, 29.5,

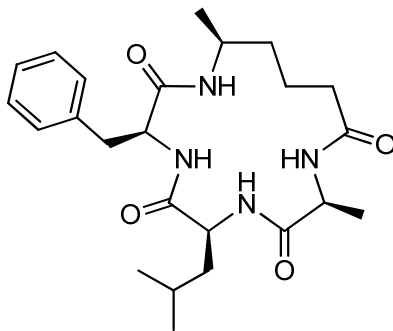
29.1, 24.0, 23.9, 22.8, 22.2, 20.9, 18.5, 17.9 ; **HRMS** $[M+Na]^+$ calcd for $C_{23}H_{34}N_4O_4$: 467.2629, found: 467.2627.

(3*S*,6*S*,9*S*,15*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron
e (Ø-5R) (60)



1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.33-7.14 (5H, m), 4.56 (1H, dd, $J = 11.4, 3.9$ Hz), 4.10-4.02 (1H, m), 3.89-3.76 (2H, m), 3.47 (1H, dd, $J = 14.7, 3.9$ Hz), 2.98 (1H, dd, $J = 15.4, 11.7$ Hz), 2.22 (1H, dt, $J = 13.3, 3.9$ Hz), 2.05 (1H, td, $J = 13.0, 3.4$ Hz), 1.75-1.61 (2H, m), 1.53 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 1.52-1.38 (3H, m), 1.38-1.27 (2H, m), 1.10 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), 0.87 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), 0.81 (3H, d, $J = 6.5$ Hz); **^{13}C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 176.5, 176.4, 174.7, 172.9, 139.6, 130.2, 129.6, 127.7, 56.1, 55.7, 52.4, 46.8, 40.8, 38.2, 36.2, 35.5, 26.1, 23.3, 22.9, 22.0, 21.9, 16.3; **HRMS** $[M+Na]^+$ calcd for $C_{23}H_{34}N_4O_4$: 467.2629, found: 467.2640.

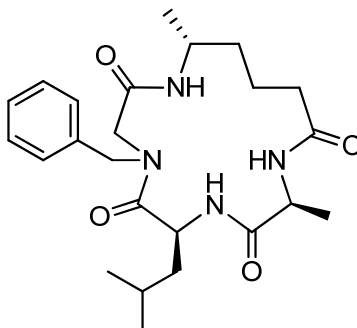
(3*S*,6*S*,9*S*,15*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron
e (Ø-5S) (61)



1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.31-7.16 (5H, m), 4.14-4.02 (2H, m), 3.79-3.68 (1H, m), 3.58-3.52 (1H, m), 3.49-3.33 (2H, m), 2.20-2.04 (2H, m), 1.84-1.56 (5H, m), 1.55-1.40 (2H, m), 1.33 (3H, d, $J = 7.3$ Hz), 1.16 (3H, d, $J = 6.7$ Hz), 0.91 (3H, d, $J = 6.7$ Hz), 0.87 (3H, d, $J = 6.5$ Hz); **^{13}C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 175.6, 175.4, 172.3, 171.3, 138.8, 128.7, 128.0, 126.1, 90.0, 58.0, 53.4, 50.3, 45.9, 37.5, 34.5, 34.2, 33.4, 24.7, 22.1, 21.6, 20.4, 20.0, 15.1; **HRMS** $[M+Na]^+$ calcd for $C_{23}H_{34}N_4O_4$:

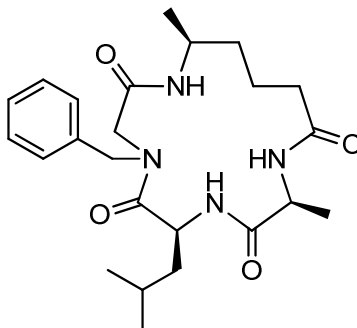
467.2629, found: 467.2630.

(6*S*,9*S*,15*R*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nphe-5*R*) (62)



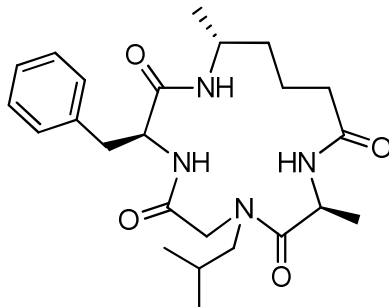
¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.49-7.24 (5H, m), 4.99-4.90 (2H, m), 4.67 (1H, d, J = 16.7 Hz), 4.41 (1H, d, J = 16.6 Hz), 4.24 (1H, q, J = 7.3 Hz), 3.79-3.69 (1H, m), 3.60 (1H, d, J = 16.4 Hz), 2.45-2.36 (1H, m), 2.04-1.94 (1H, m), 1.85-1.73 (1H, m), 1.64-1.44 (5H, m), 1.38 (3H, d, J = 7.3 Hz), 1.31-1.21 (1H, m), 0.99 (3H, d, J = 6.5 Hz), 0.78 (3H, d, J = 6.5 Hz), 0.72 (3H, d, 6.5 Hz); **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 177.2, 176.0, 175.6, 138.1, 130.5, 129.3, 128.4, 54.4, 53.7, 52.3, 49.3, 47.3, 42.7, 36.0, 35.2, 26.0, 24.4, 23.7, 22.3, 22.1, 17.1; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2625.

(6*S*,9*S*,15*S*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nphe-5*S*) (63)



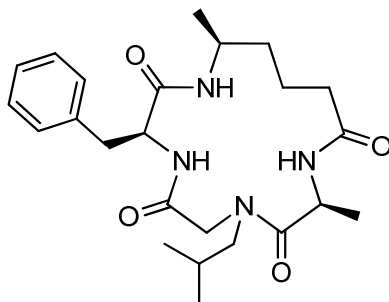
¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.45-7.35 (2H, m), 7.35-7.28 (1H, m), 7.28-7.18 (2H, m), 5.27 (1H, d, J = 17.4 Hz), 4.69 (1H, dd, J = 16.5, 1.2 Hz), 4.42 (1H, d, J = 17.4 Hz), 4.21 (1H, q, J = 7.2 Hz), 4.00 (1H, dd, J = 8.6, 5.7 Hz), 3.78-3.67 (1H, m), 3.25 (1H, d, J = 16.6 Hz), 2.21-2.11 (2H, m), 1.81-1.49 (7H, m), 1.35 (3H, d, J = 7.2 Hz), 1.14 (3H, d, J = 6.5 Hz), 0.88-0.79 (6H, m); **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 177.4, 176.1, 173.8, 170.7, 138.1, 130.3, 129.0, 127.8, 53.3, 52.3, 52.0, 51.5, 47.5, 41.8, 36.1, 34.9, 25.8, 24.4, 23.6, 22.3, 21.7, 16.9; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2630.

(3*S*,9*S*,15*R*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nleu-5R) (64)



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.06-7.94 (1H, m), 7.83-7.68 (1H, m), 7.68-7.50 (2H, m), 7.30-7.11 (5H, m), 6.96 (1H, s), 4.79-4.62 (1H, m), 4.61-4.51 (1H, m), 4.49-4.35 (1H, m), 3.84-3.67 (1H, m), 3.60-3.44 (1H, m), 3.21-3.03 (2H, m), 3.01-2.88 (1H, m), 2.87-2.74 (1H, m), 2.34-2.17 (1H, m), 2.14-1.92 (1H, m), 1.90-1.71 (2H, m), 1.58-1.30 (3H, m), 1.31-1.20 (1H, m), 1.16 (2H, d, *J* = 6.4 Hz), 1.06 (2H, d, *J* = 6.6 Hz), 0.91 (2H, d, *J* = 6.6 Hz), 0.88-0.83 (2H, m), 0.83-0.78 (2H, d, *J* = 6.6 Hz), 0.74-0.64 (3H, m); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 173.2, 172.1, 172.0, 171.3, 170.2, 169.6, 168.5, 168.1, 138.3, 137.7, 129.1, 128.14, 128.10, 126.3, 126.2, 55.5, 54.5, 54.2, 54.1, 52.9, 50.1, 43.4, 43.1, 42.8, 40.4, 37.4, 35.7, 35.3, 34.6, 34.0, 33.2, 27.1, 25.5, 22.6, 21.6, 21.4, 20.1, 20.04, 19.96, 19.8, 19.4, 17.9, 17.5; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2623.

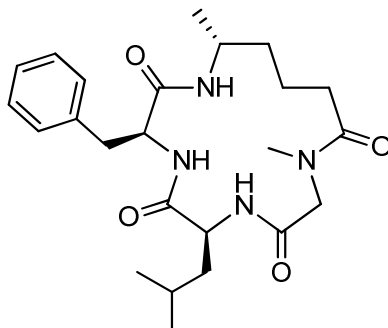
(3*S*,9*S*,15*S*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nleu-5S) (65)



¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.32-7.15 (5H, m), 4.57 (1H, q, *J* = 7.2 Hz), 4.44 (1H, dd, *J* = 11.7, 3.6 Hz), 4.07 (1H, d, *J* = 14.7 Hz), 3.84-3.71 (1H, m), 3.65-3.54 (1H, m), 3.42 (1H, dd, *J* = 14.4, 3.6 Hz), 3.24-3.15 (1H, m), 2.94 (1H, dd, *J* = 14.2, 11.6 Hz), 2.15-2.04 (2H, m), 1.94-1.80 (2H, m), 1.75-1.51 (2H, m), 1.45-1.35 (1H, m), 1.32 (3H, d, *J* = 7.2 Hz), 1.15 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 0.97 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 0.89 (3H, d, *J* = 6.7 Hz); **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 177.8, 177.2, 173.2, 171.7, 139.8, 130.1, 129.6, 127.7, 59.2, 57.1, 53.9, 47.8, 47.6, 37.2, 36.0, 35.6, 29.7, 24.8, 22.9, 20.61, 20.57,

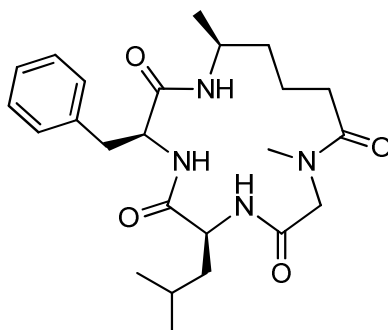
16.6; **HRMS** $[M+Na]^+$ calcd for $C_{23}H_{34}N_4O_4$: 467.2629, found: 467.2621.

(3*S*,6*S*,15*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-15-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanete trone (Nala-5R) (66)



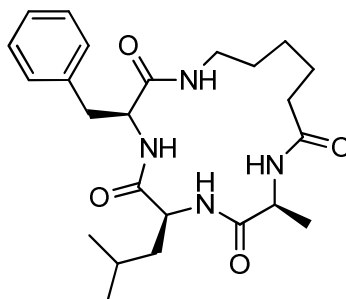
1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.33-7.15 (5H, m), 4.57 (1H, dd, $J = 11.8, 3.9$ Hz), 4.10-4.02 (1H, m), 3.89-3.76 (2H, m), 3.47 (1H, dd, $J = 14.4, 3.9$ Hz), 2.98 (1H, dd, $J = 15.3, 11.7$ Hz), 2.22 (1H, dt, $J = 13.3, 3.8$ Hz), 2.05 (1H, td, $J = 13.3, 3.4$ Hz), 1.74-1.61 (2H, m), 1.58-1.41 (3H, m), 1.53 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 1.41-1.28 (2H, m), 1.10 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), 0.87 (3H, d, $J = 6.3$ Hz), 0.82 (3H, d, $J = 6.5$ Hz); **^{13}C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 177.3, 174.8, 174.4, 173.0, 139.4, 130.4, 130.2, 129.7, 129.6, 127.8, 55.9, 55.0, 54.7, 47.2, 40.8, 39.9, 38.7, 35.7, 31.9, 25.9, 23.4, 23.3, 22.0, 21.6; **HRMS** $[M+Na]^+$ calcd for $C_{23}H_{34}N_4O_4$: 467.2629, found: 467.2628.

(3*S*,6*S*,15*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-15-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanete trone (Nala-5S) (67)



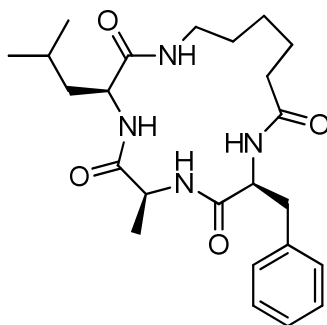
1H NMR (300 MHz, MeOD): δ 4.34-4.14 (5H, m), 4.70-4.60 (1H, m), 4.39-4.23 (1H, m), 4.14-3.90 (1H, m), 3.55 (1H, d, $J = 15.0$ Hz), 3.25-3.13 (3H, m), 2.99-2.86 (1H, dd, $J = 13.5, 10.6$ Hz), 2.64-1.75 (4H, m), 1.74-1.25 (6H, m), 1.25-1.12 (3H, m), 0.92-0.74 (6H, m); **^{13}C NMR (75 MHz, MeOD):** δ 175.2, 171.9, 137.0, 128.8, 128.1, 126.4, 55.6, 53.5, 52.8, 46.1, 39.5, 38.6, 37.3, 34.4, 32.9, 31.1, 24.4, 24.3, 22.0, 21.6, 19.9, 17.1, 17.0; **HRMS** $[M+Na]^+$ calcd for $C_{23}H_{34}N_4O_4$: 467.2629, found: 467.2629.

**(3*S*,6*S*,9*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclohexadecanetetron (reg-6)
(68)**



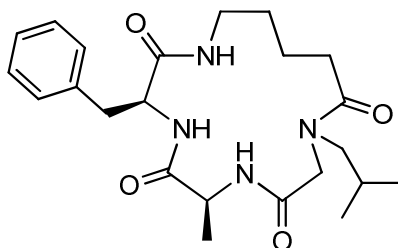
¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.36-7.15 (5H, m), 4.32-4.24 (1H, m), 4.11 (1H, q, J = 7.3 Hz), 3.99-3.91 (1H, m), 3.46-3.37 (1H, m), 3.35-3.26 (1H, m), 3.18-3.01 (2H, m), 2.32-2.15 (2H, m), 1.75-1.48 (4H, m), 1.48-1.33 (2H, m), 1.38 (3H, d, J = 7.2 Hz), 1.33-1.19 (2H, m), 0.86 (3H, d, J = 6.3 Hz), 0.83 (3H, d, J = 6.2 Hz); **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 176.5, 176.0, 174.3, 173.1, 139.5, 130.4, 129.6, 127.8, 57.7, 55.2, 51.8, 41.4, 39.8, 37.2, 36.1, 29.1, 26.3, 26.0, 25.9, 23.4, 22.4, 17.5; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2619.

**(3*S*,6*S*,9*S*)-9-Benzyl-3-isobutyl-6-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclohexadecanetetron (alt-6)
(69)**



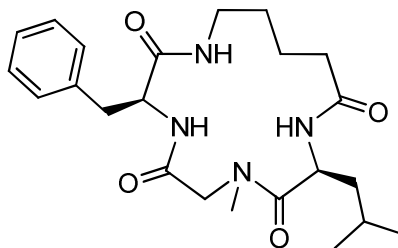
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.29-8.10 (3H, m), 7.69-7.55 (1H, m), 7.33-7.15 (5H, m), 4.34-4.22 (1H, m), 4.02-3.87 (2H, m), 3.45-3.31 (2H, s), 3.26-3.13 (1H, m), 3.04-2.81 (3H, m), 2.18-2.05 (1H, m), 2.01-1.87 (1H, m), 1.68-1.57 (2H, m), 1.57-1.46 (2H, m), 1.46-1.34 (2H, m), 1.34-1.20 (1H, m), 1.24 (3H, d, J = 7.0 Hz), 1.19-1.05 (2H, m), 0.87 (3H, d, J = 6.5 Hz), 0.82 (3H, d, J = 6.5 Hz); **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 172.5, 171.8, 171.5, 170.9, 137.9, 129.0, 128.2, 126.3, 99.5, 55.1, 52.3, 50.5, 42.1, 40.4, 38.3, 36.8, 34.8, 28.3, 25.3, 24.9, 24.5, 22.9, 21.6, 17.2; **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 467.2629, found: 467.2658.

(3S,6S)-3-benzyl-10-isobutyl-6-methyl-1,4,7,10-tetraazacyclopentadecane-2,5,8,11-tetraone (HypA) (70)



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.89 (0.6H, d, J = 5.3 Hz, H_N Ala), 8.77 (0.4H, d, J = 5.6 Hz, H_N Ala), 8.48 (0.4H, br s), 8.42 (0.4H, d, J = 9.1 Hz, H_N Phe), 7.45-7.40 (0.4H, m, H_N Linker), 7.37 (0.6H, d, J = 9.6 Hz, H_N Phe), 7.31-7.12 (5H, m), 6.47 (0.6H, d, J = 8.5 Hz, H_N Linker), 6.30 (0.2H, br s), 4.45-4.28 (1H, m, H _{α} Phe), 4.16 (1H, d, J = 14.7 Hz, H _{α} Nleu), 3.93-3.76 (1H, m, H _{α} Ala), 3.62 (1H, d, J = 14.7 Hz, H _{α} Nleu), 3.66-3.58 (2H, m), 3.25-3.17 (1H, m, H₅ Linker), 3.16-3.08 (1H, m, H _{β} Phe), 2.99-2.90 (1H, ddd, J = 9.9, 6.8, 3.2 Hz, H _{β} Phe), 2.87-2.75 (1H, m, H₅ Linker), 2.74-2.65 (1H, m), 2.41-2.29 (0.4H, m), 2.04-1.95 (0.6H, dt, J = 14.3, 3.4 Hz), 1.89-1.69 (1H, m, H _{γ} Nleu), 1.64-1.34 (2H, m, H₄ Linker), 1.16-1.04 (1H, m), 1.00 (1H, d, J = 7.3 Hz, H _{β} Ala), 0.92 (1.5H, d, J = 6.7 Hz, H _{δ} Leu), 0.87 (1.5H, d, J = 6.7 Hz, H _{δ} Leu), 0.82 (1.5H, d, J = 6.7 Hz, H _{δ} Leu), 0.75 (1.5H, d, J = 6.7 Hz, H _{δ} Leu). **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 453.2472, found: 453.2472.

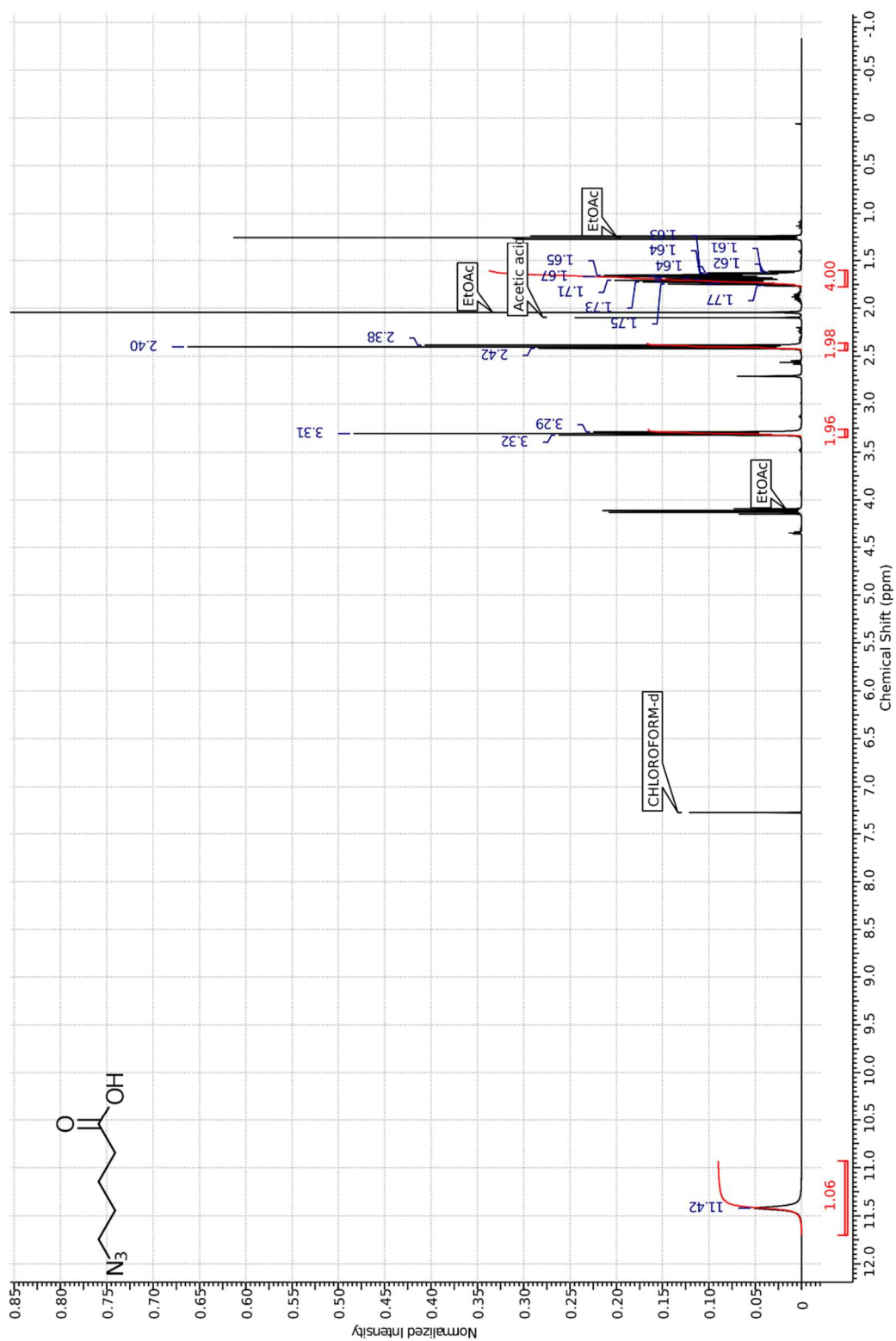
(3S,9S)-3-benzyl-9-isobutyl-7-methyl-1,4,7,10-tetraazacyclopentadecane-2,5,8,11-tetraone (HypB) (71)

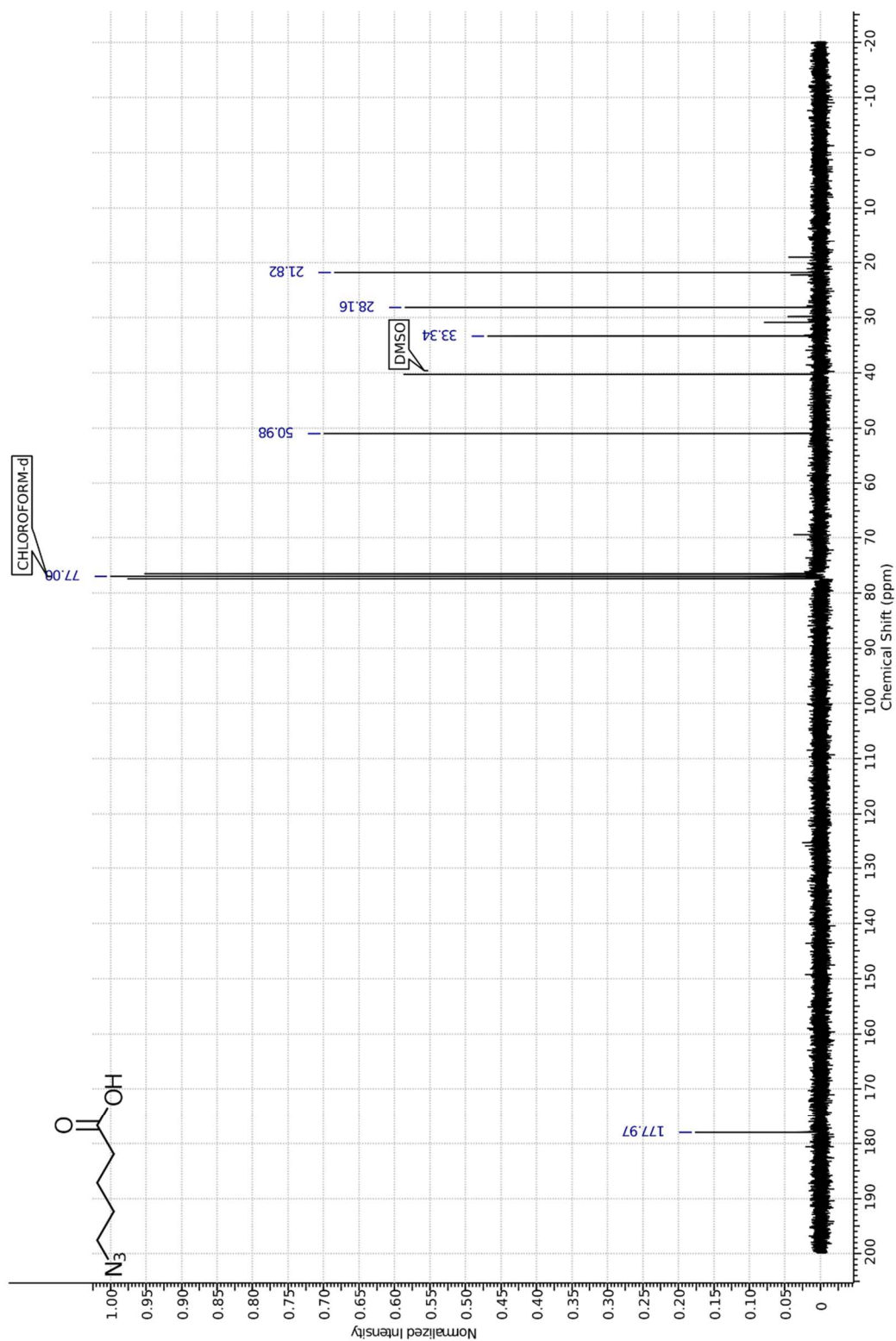


¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.32 (1H, d, J = 8.4 Hz, H_N Phe), 7.92 (1H, d, J = 8.4 Hz, H_N Leu), 7.37 (1H, t, J = 5.6 Hz, H_N Linker), 7.31-7.14 (5H, m), 4.75-4.62 (1H, m, H _{α} Leu), 4.29 (1H, d, J = 14.2 Hz, H _{α} Nala), 4.27-4.21 (1H, m, H _{α} Phe), 3.21 (1H, d, J = 14.0 Hz, H _{α} Nala), 3.17-3.10 (1H, m, H _{β} Phe), 3.13 (3H, s, H _{β} Nala), 3.04 (1H, q, J = 5.8 Hz, H₅ Linker), 2.73 (1H, dd, J = 14.0, 10.3 Hz), 2.22 (1H, ddd, J = 12.6, 9.7, 4.7 Hz, H₂ Linker), 1.95-1.87 (1H, m, H₂ Linker), 1.68-1.54 (2H, m, H₄ Linker and H _{γ} Leu), 1.53-1.32 (4H, m, H _{β} Leu), 1.26-1.13 (1H, m, H₄ Linker), 0.89 (6H, dd, J = 6.5, 5.5 Hz, H _{δ} Leu). **HRMS [M+Na]⁺** calcd for C₂₃H₃₄N₄O₄: 453.2472, found: 453.2470.

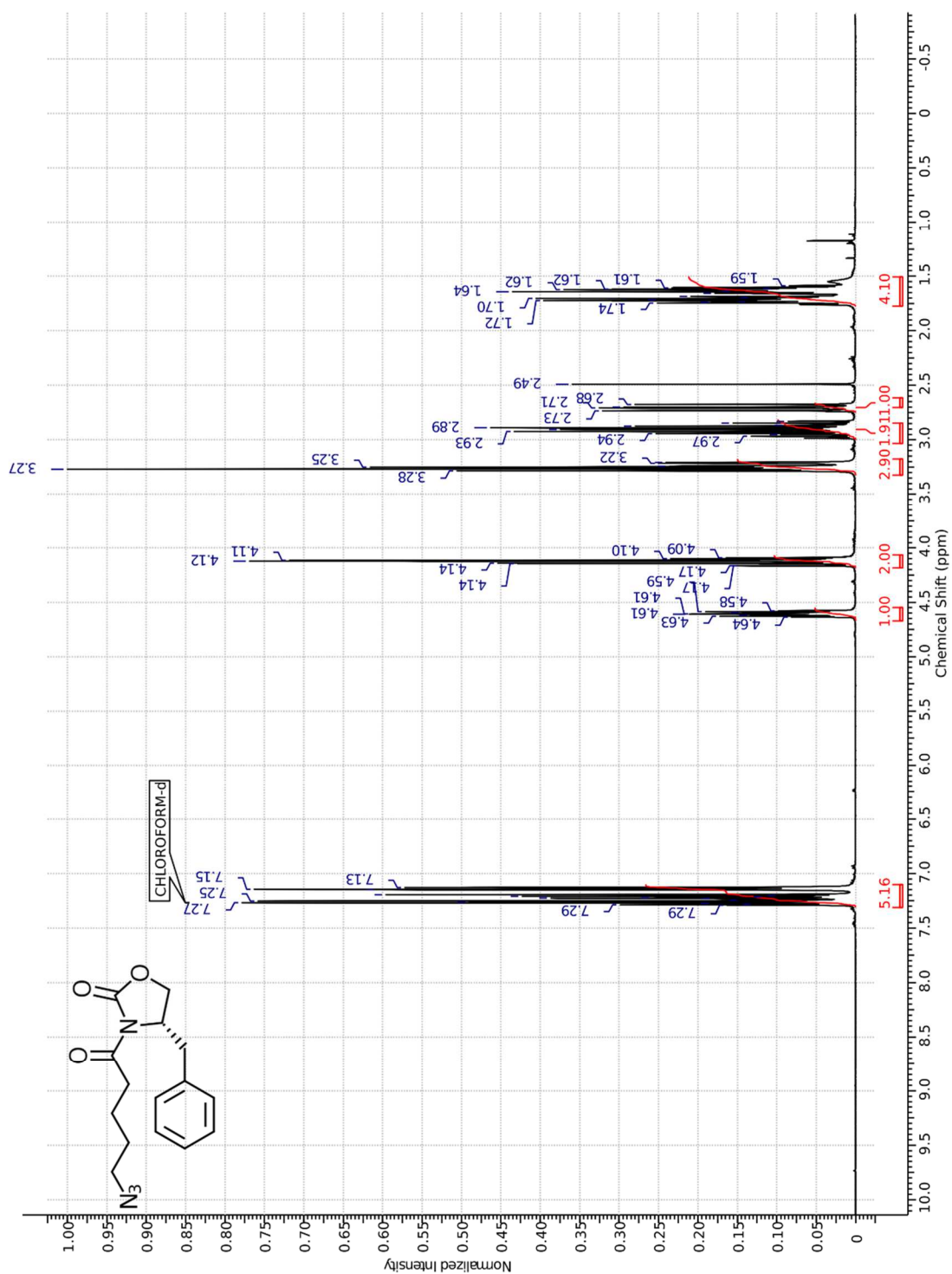
ANNEXE 2 : SPECTRES DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE DES PROTONS

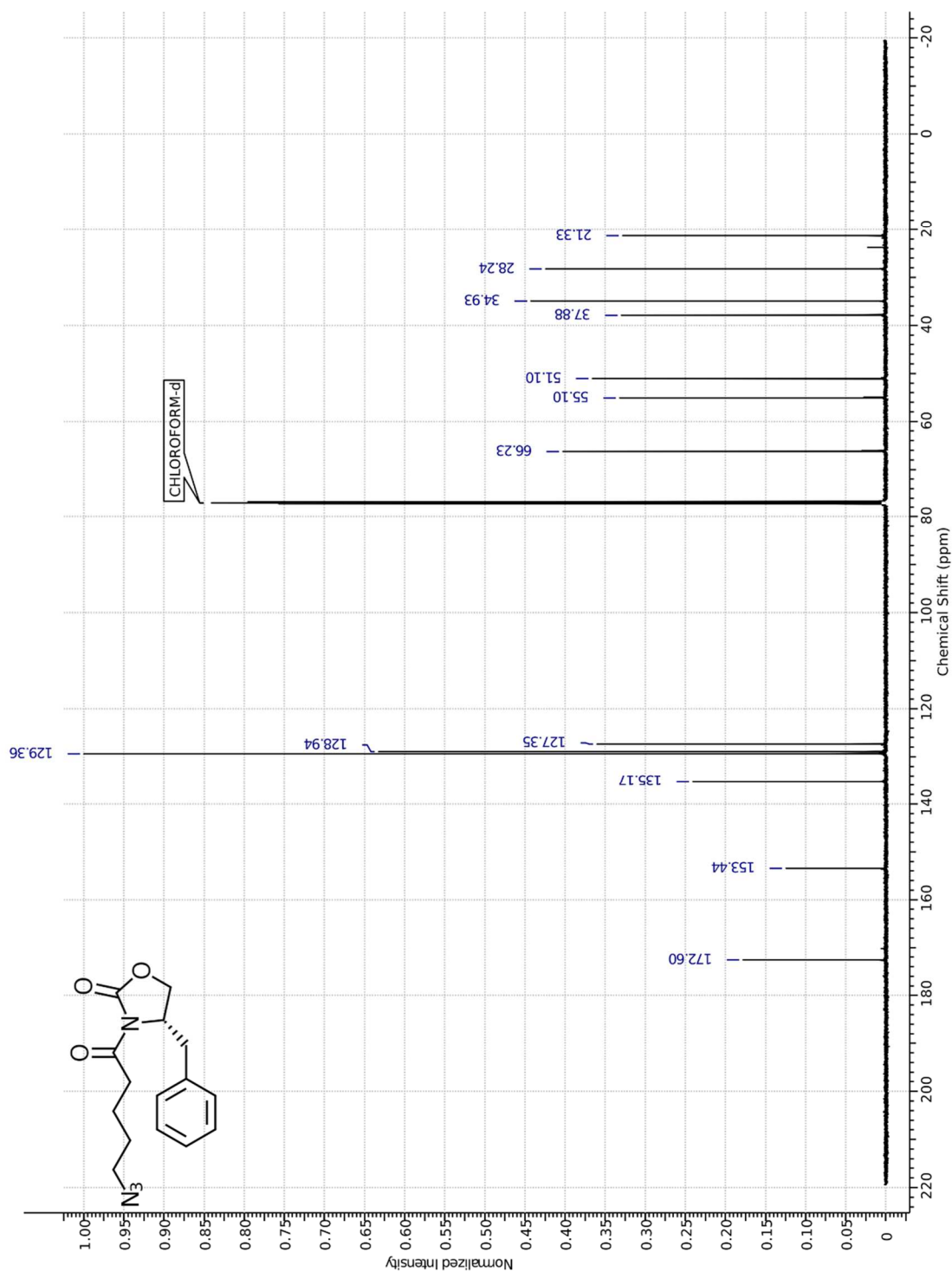
5-Azidovaleric acid (9)



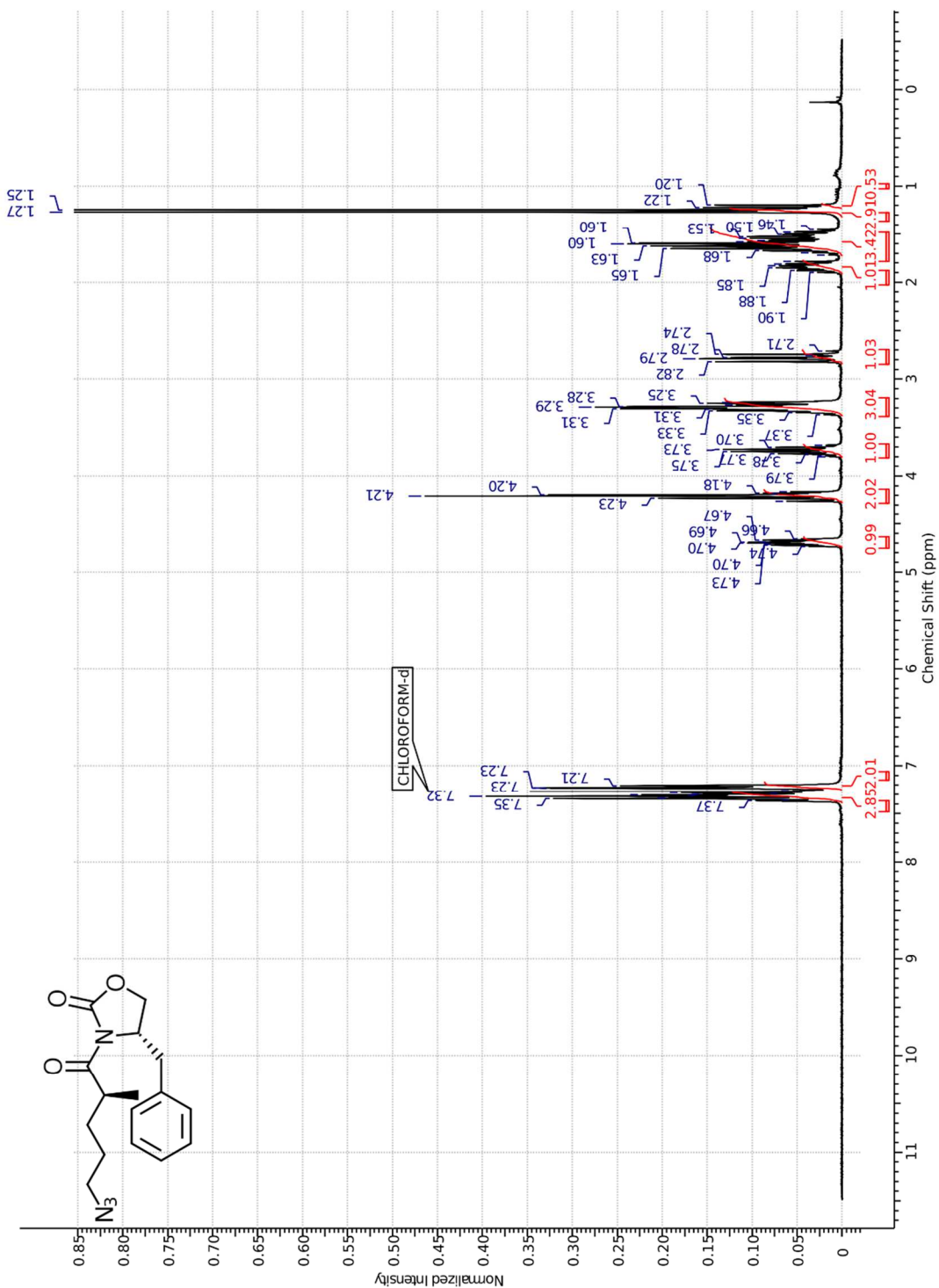


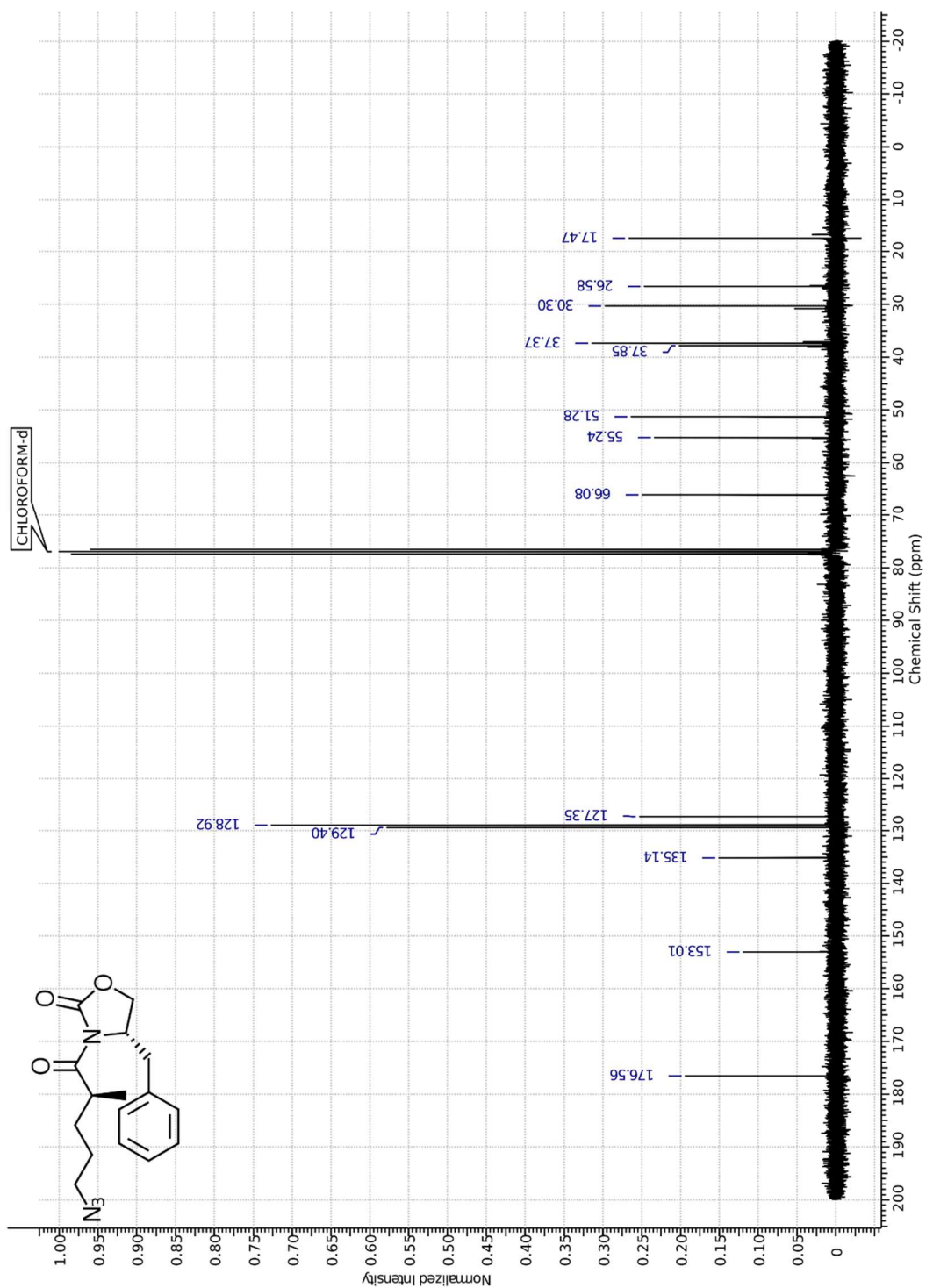
1-[(4*S*)-4-Benzyl-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]-5-azido-1-pentanone (10)

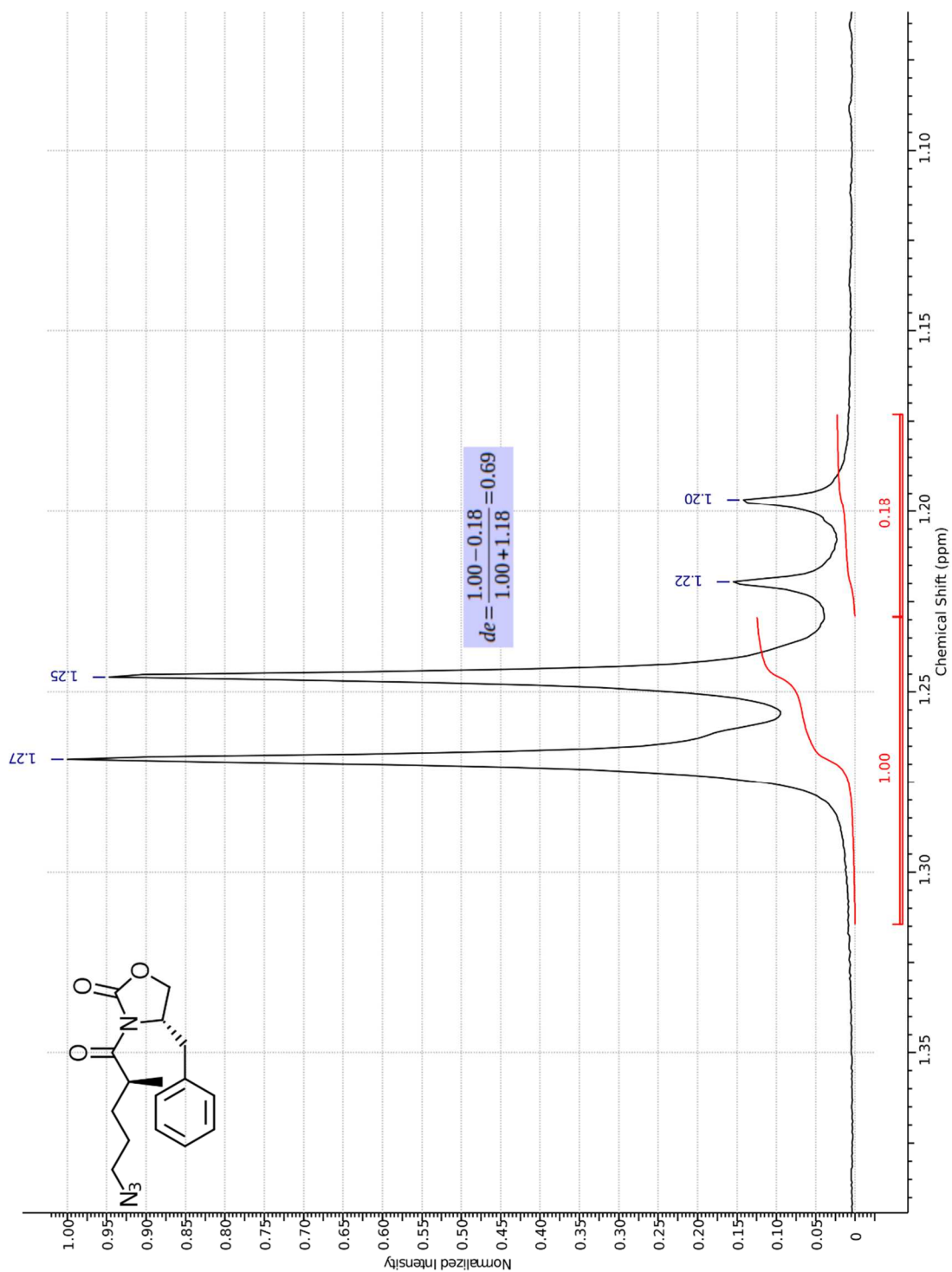




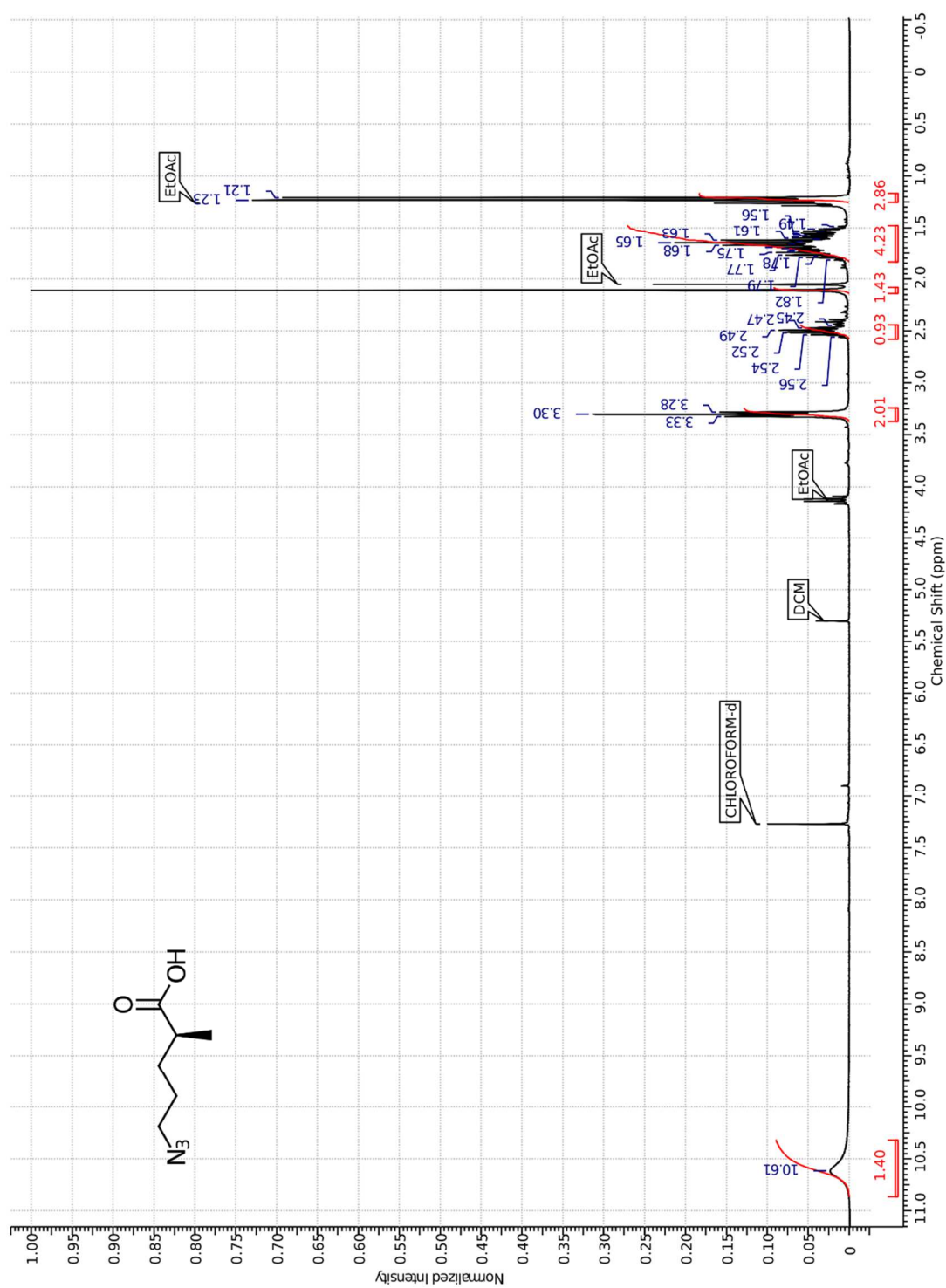
(2*S*)-1-[(4*S*)-4-Benzyl-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]-5-azido-2-methyl-1-pentanone (11)

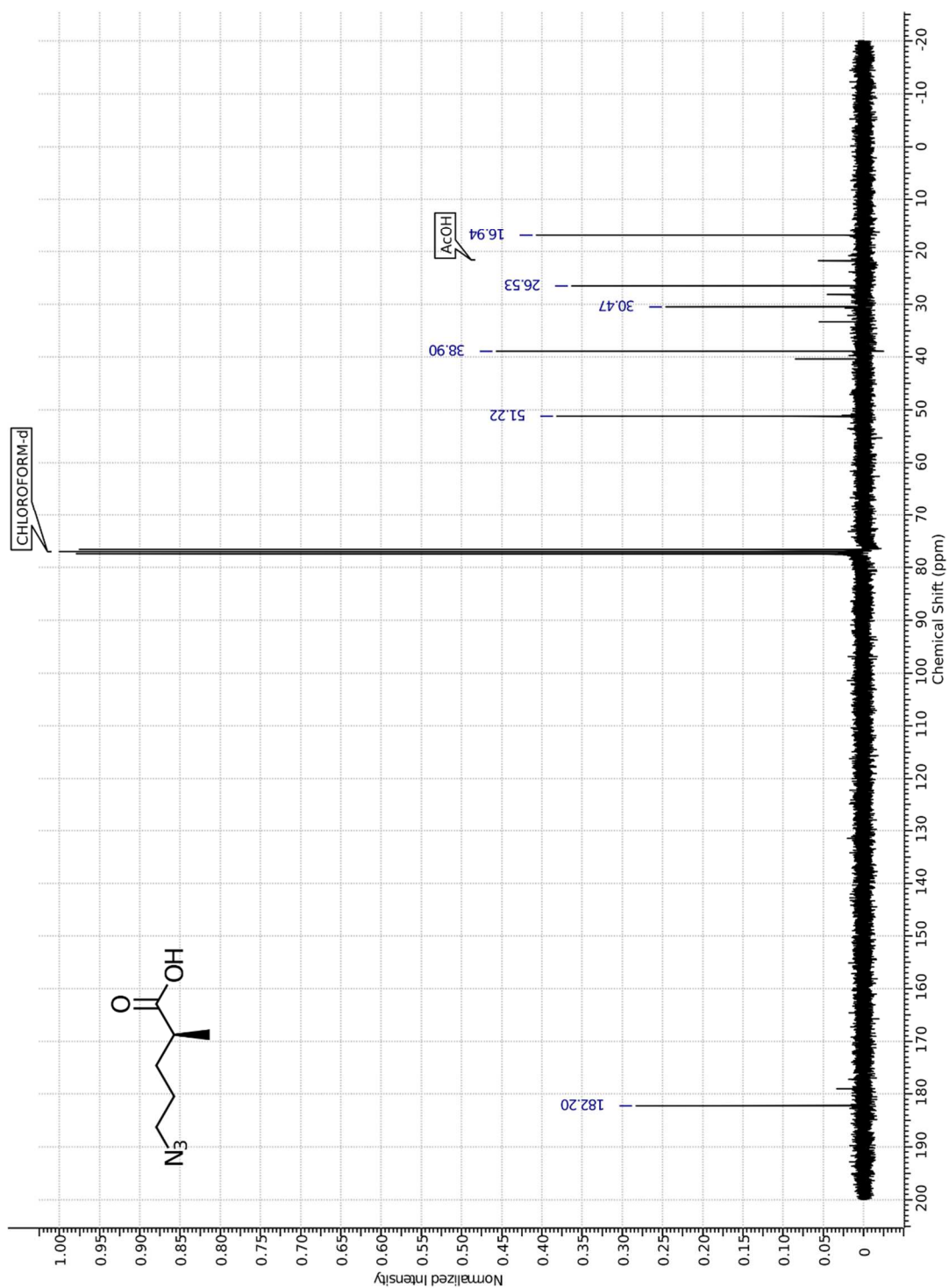




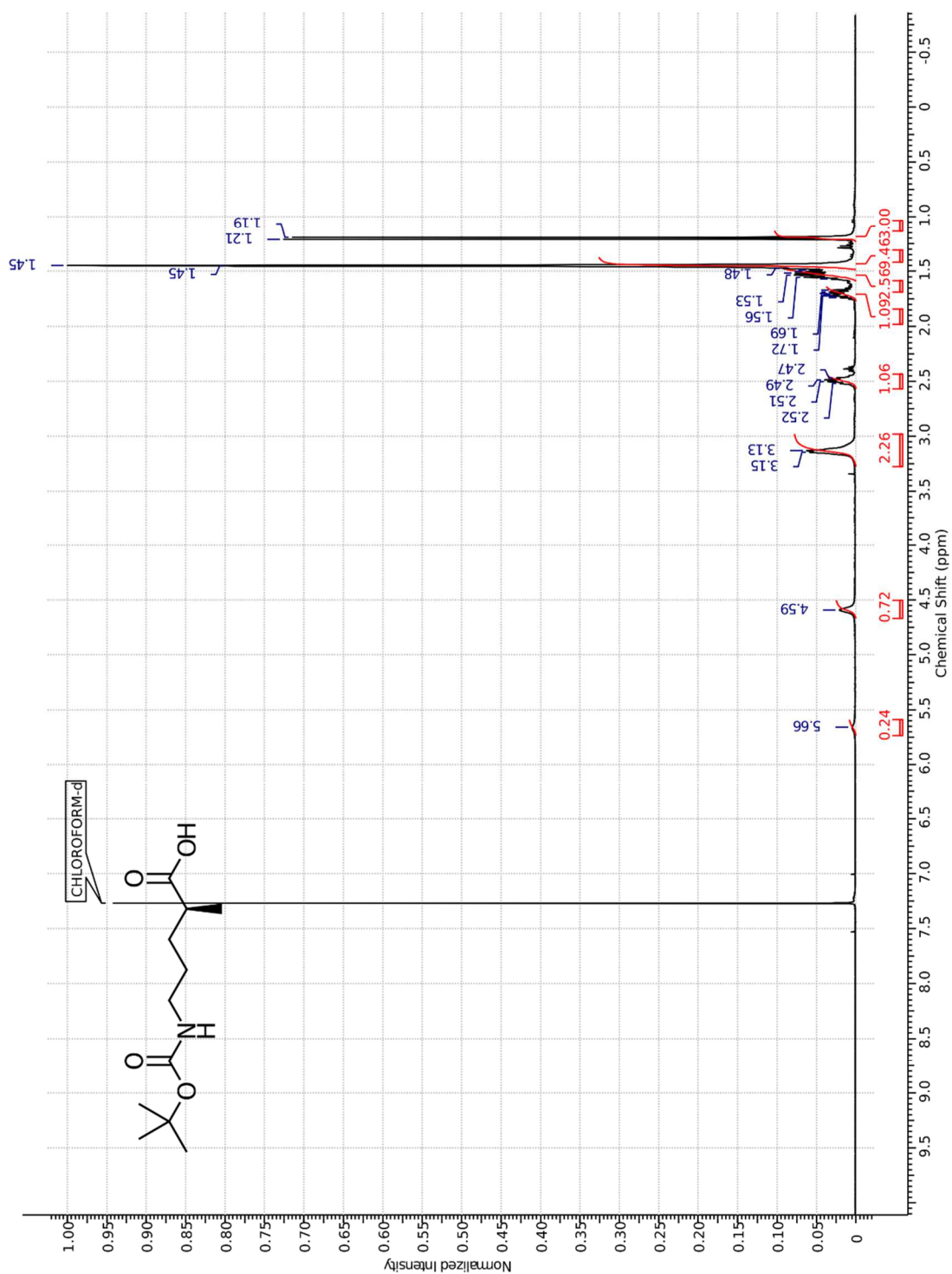


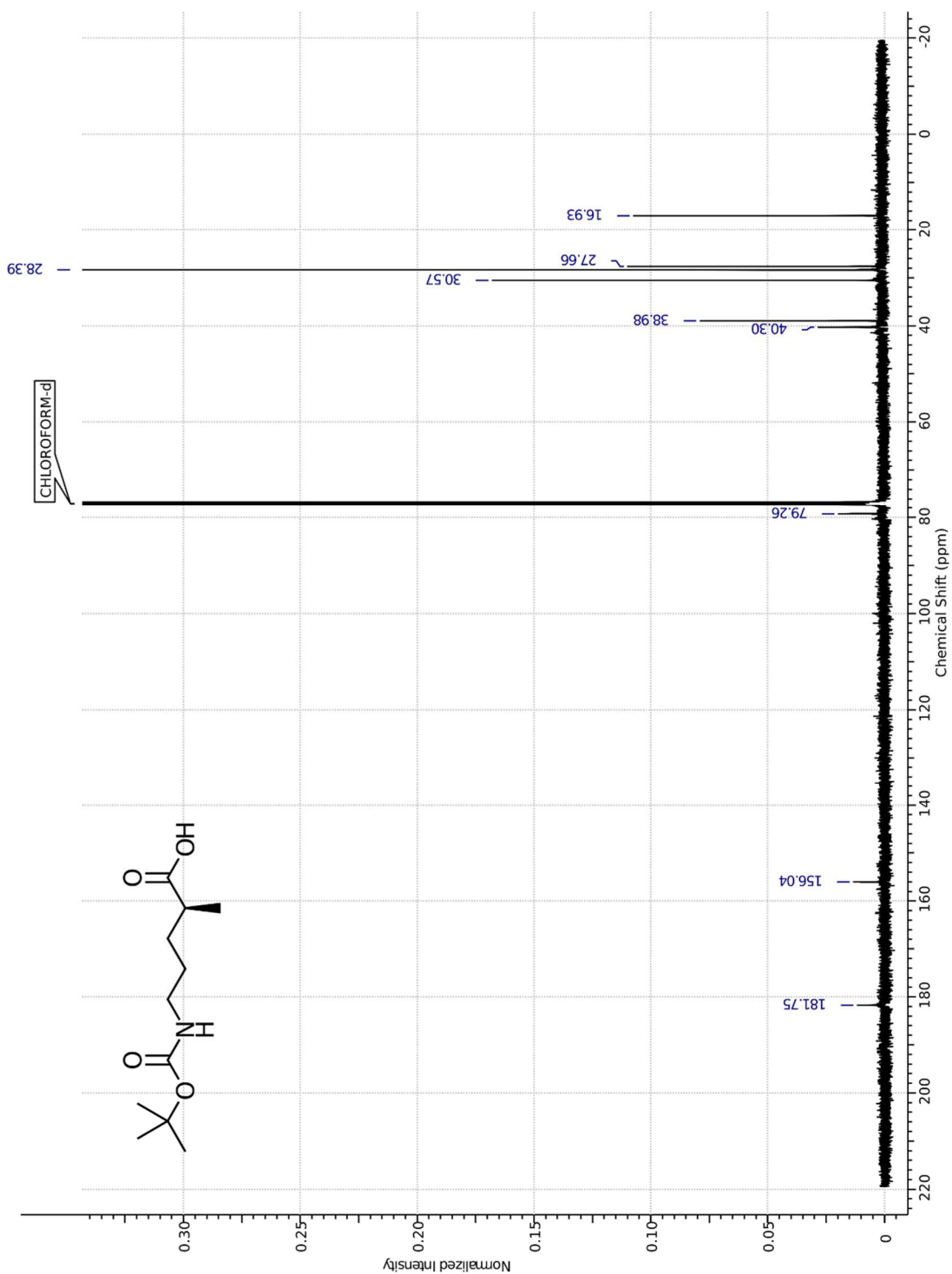
(2S)-5-Azido-2-methylvaleric acid (12)



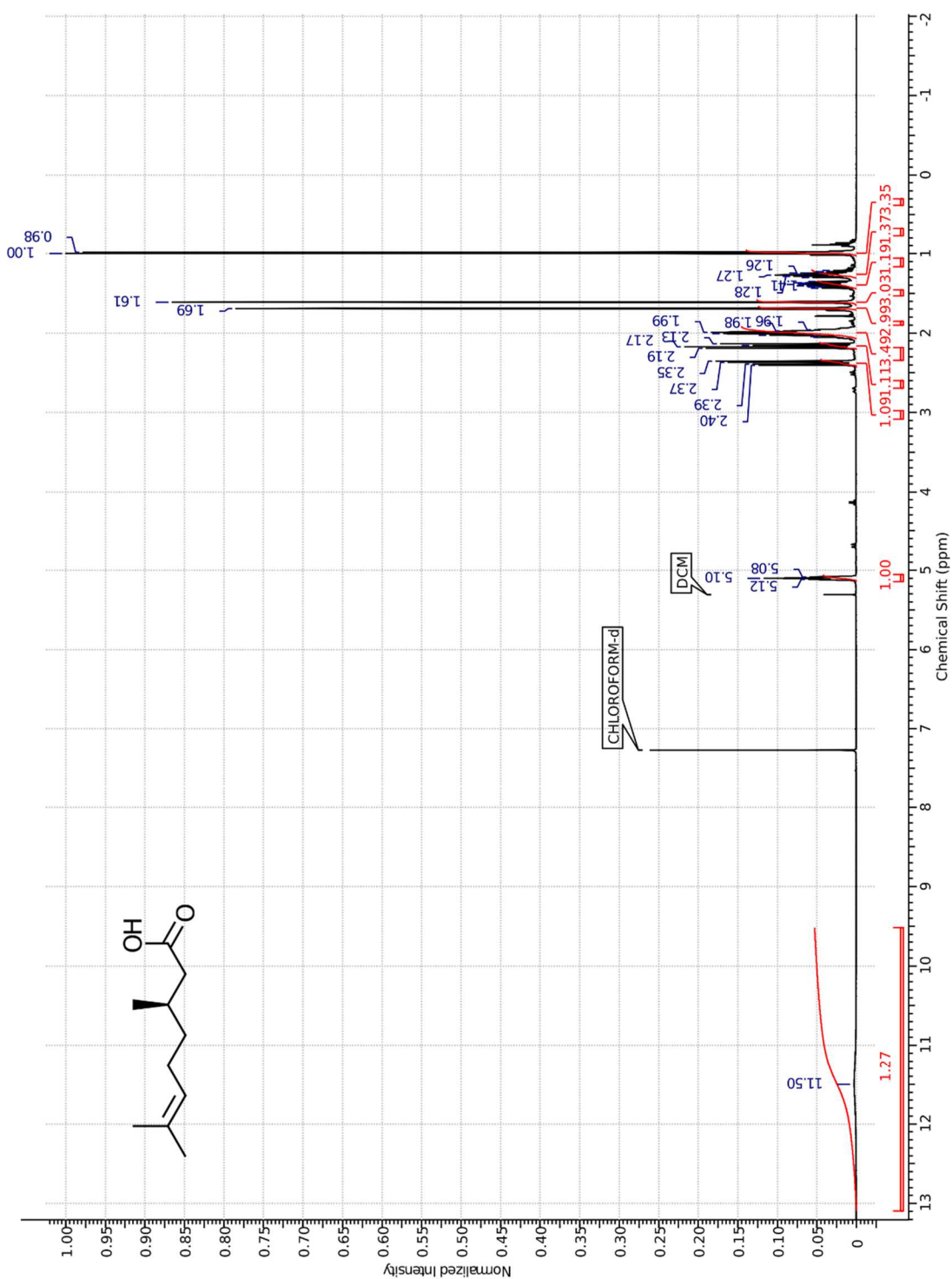


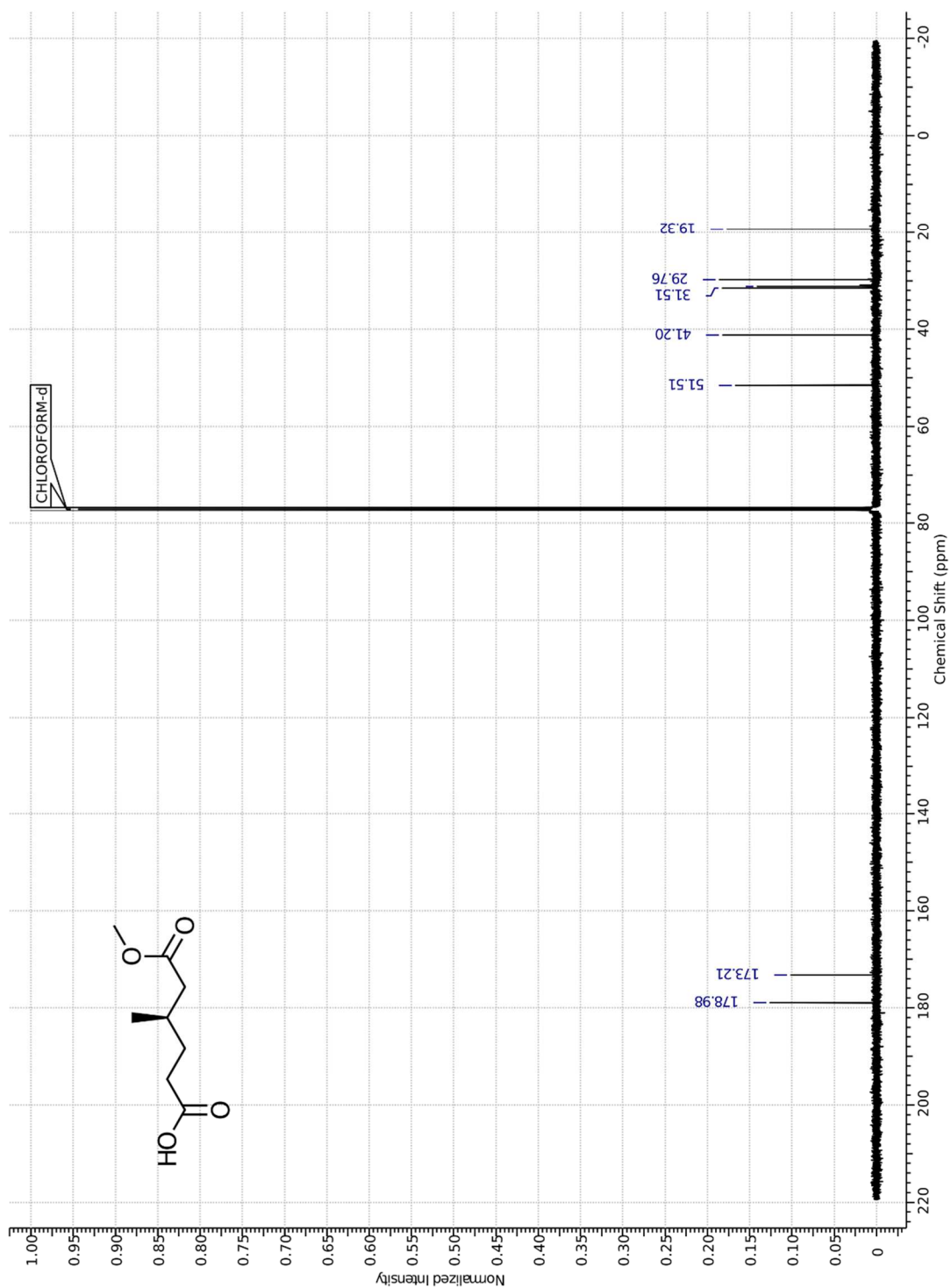
(2S)-2-Methyl-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)valeric acid (13)



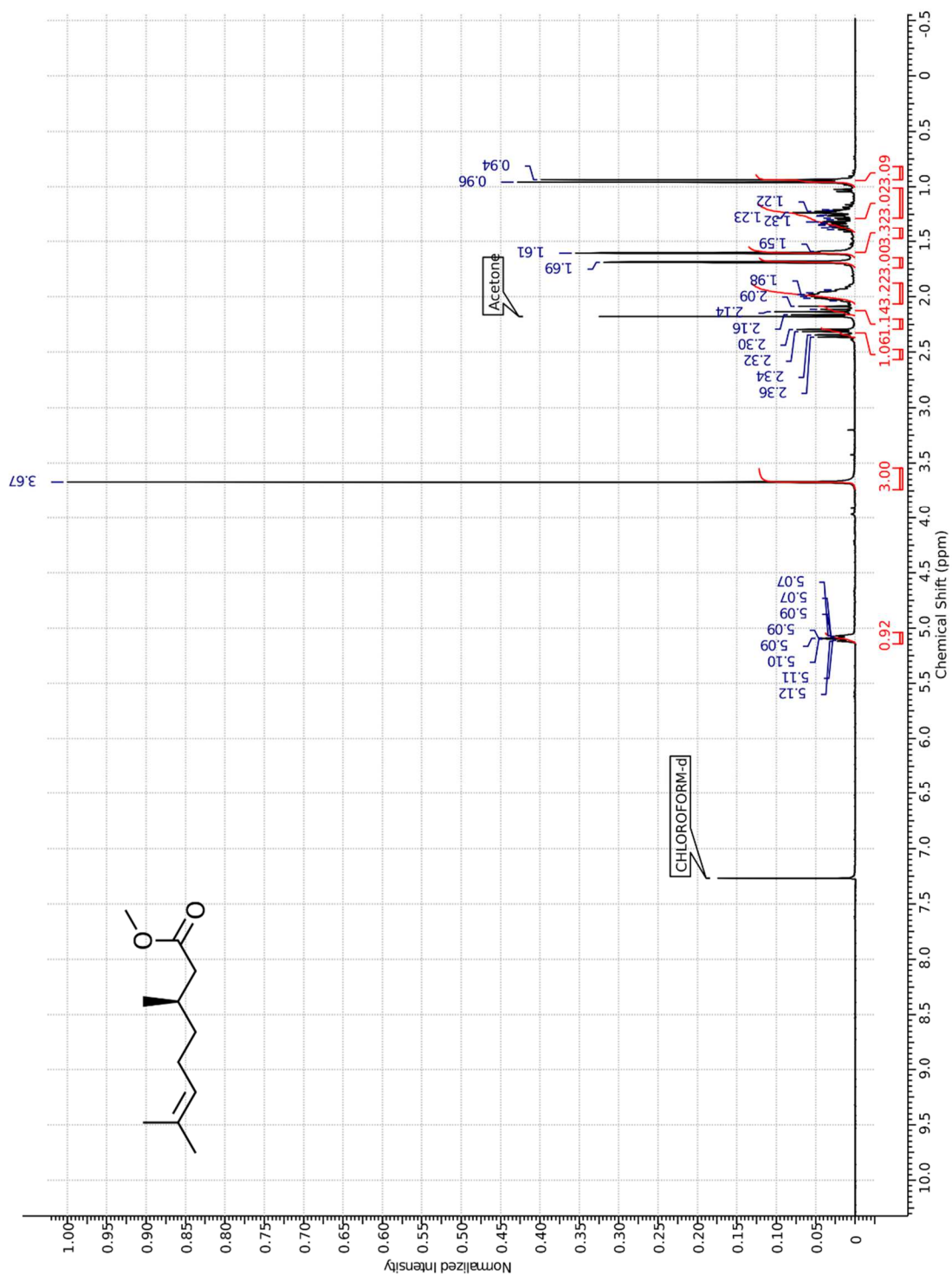


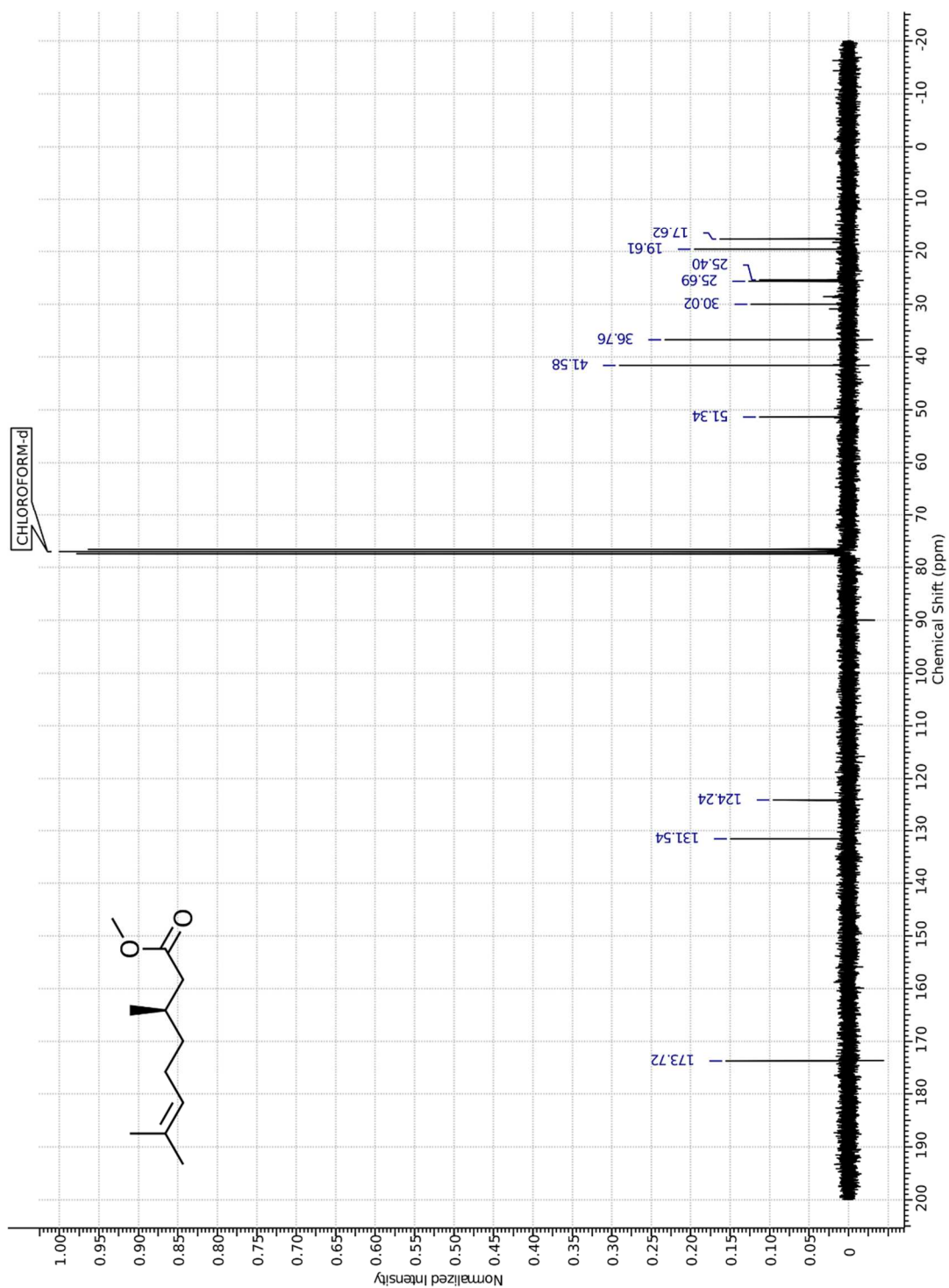
(3*R*)-3,7-Dimethyl-6-octenoic acid (15)



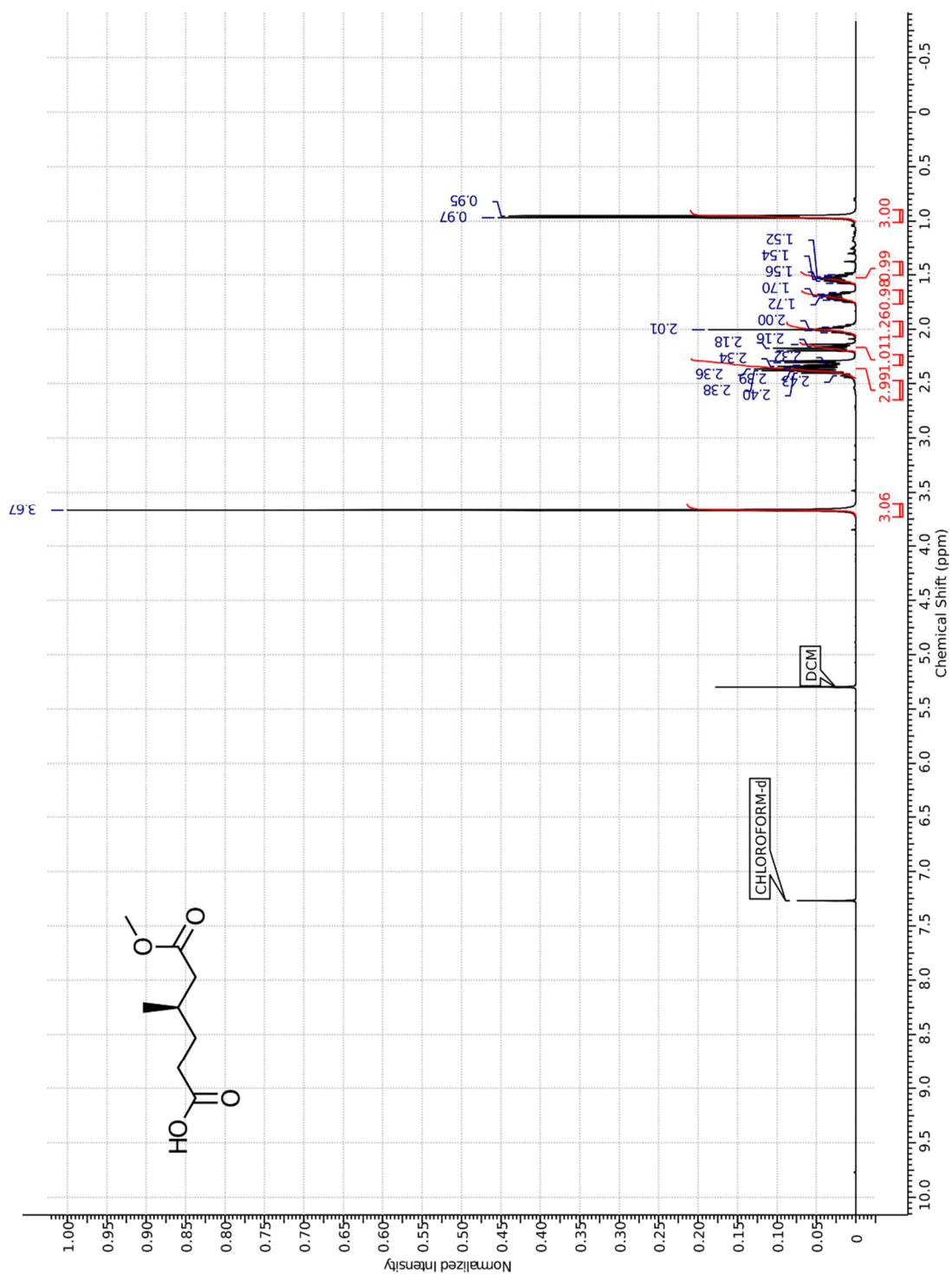


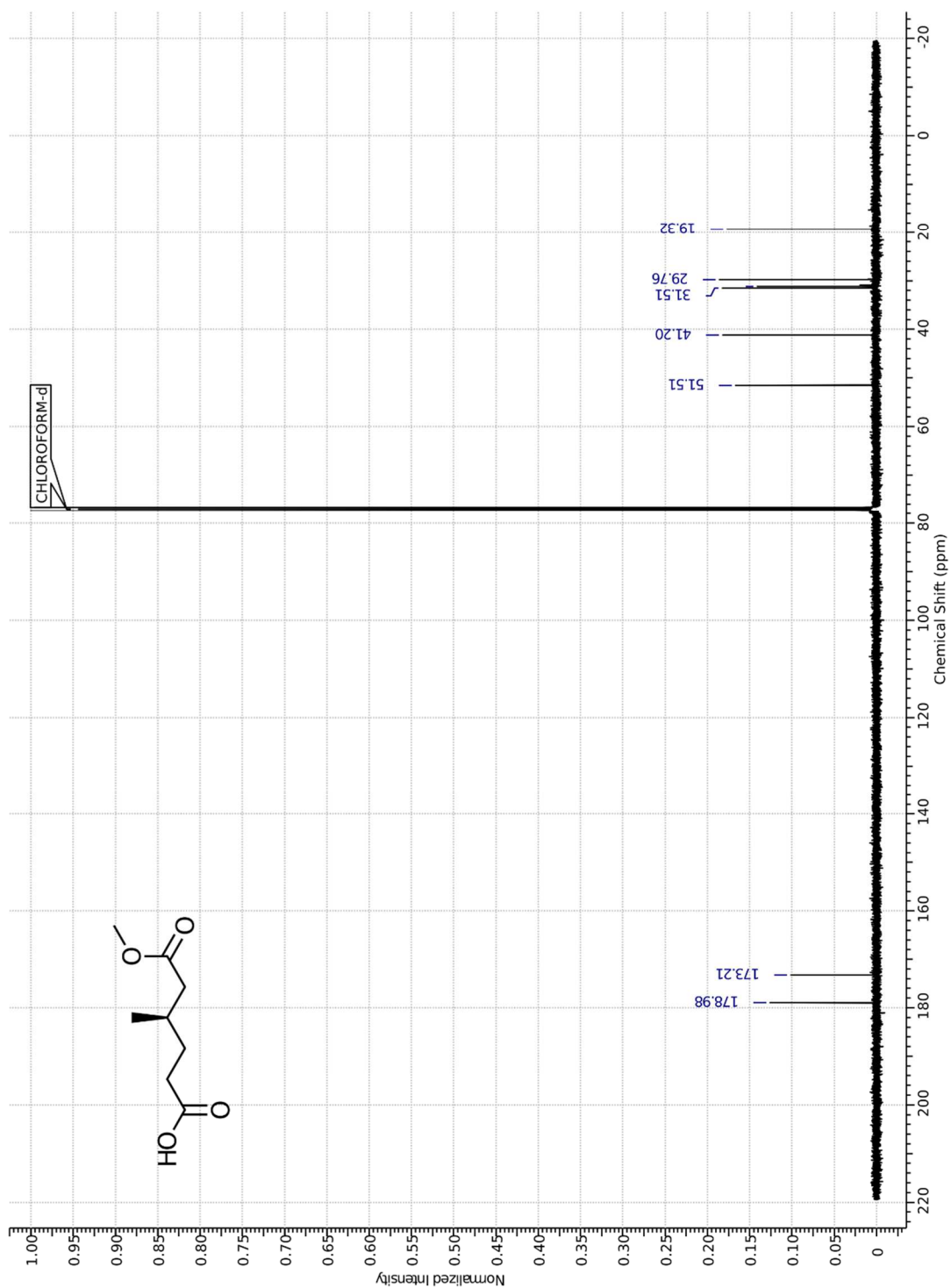
Methyl (3*R*)-3,7-dimethyl-6-octenoate (16)



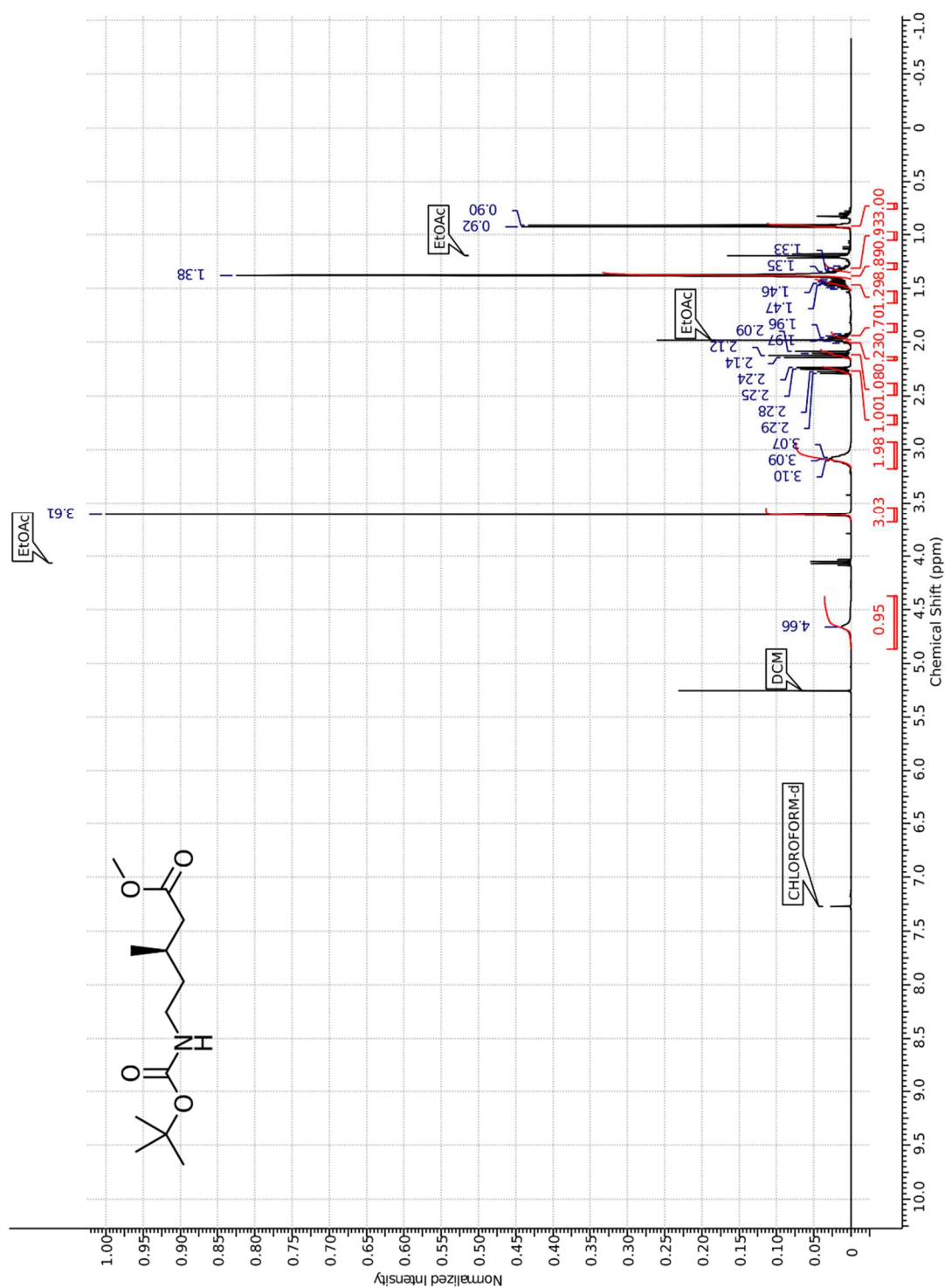


(4R)-5-Methoxycarbonyl-4-methylvaleric acid (17)

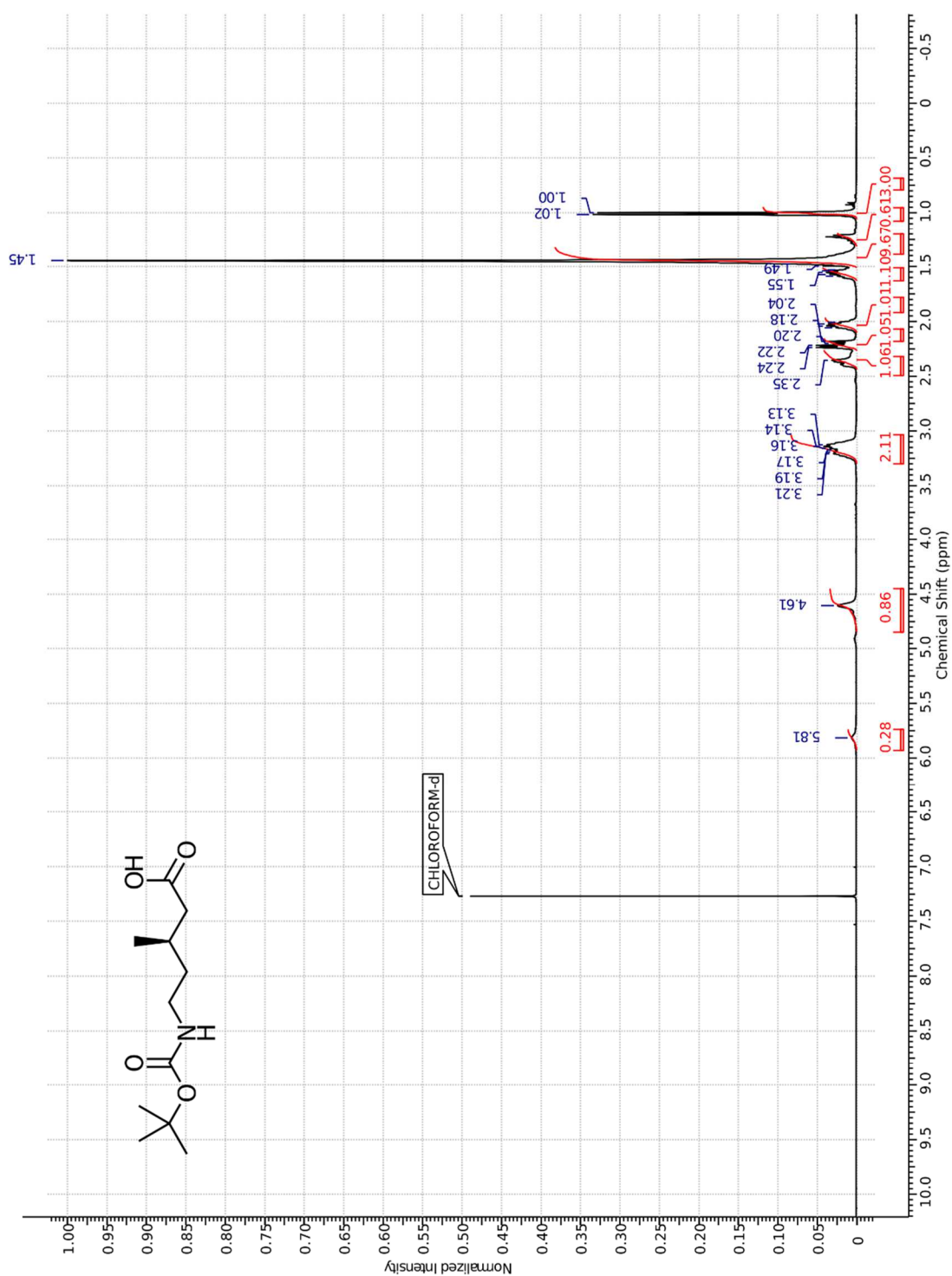


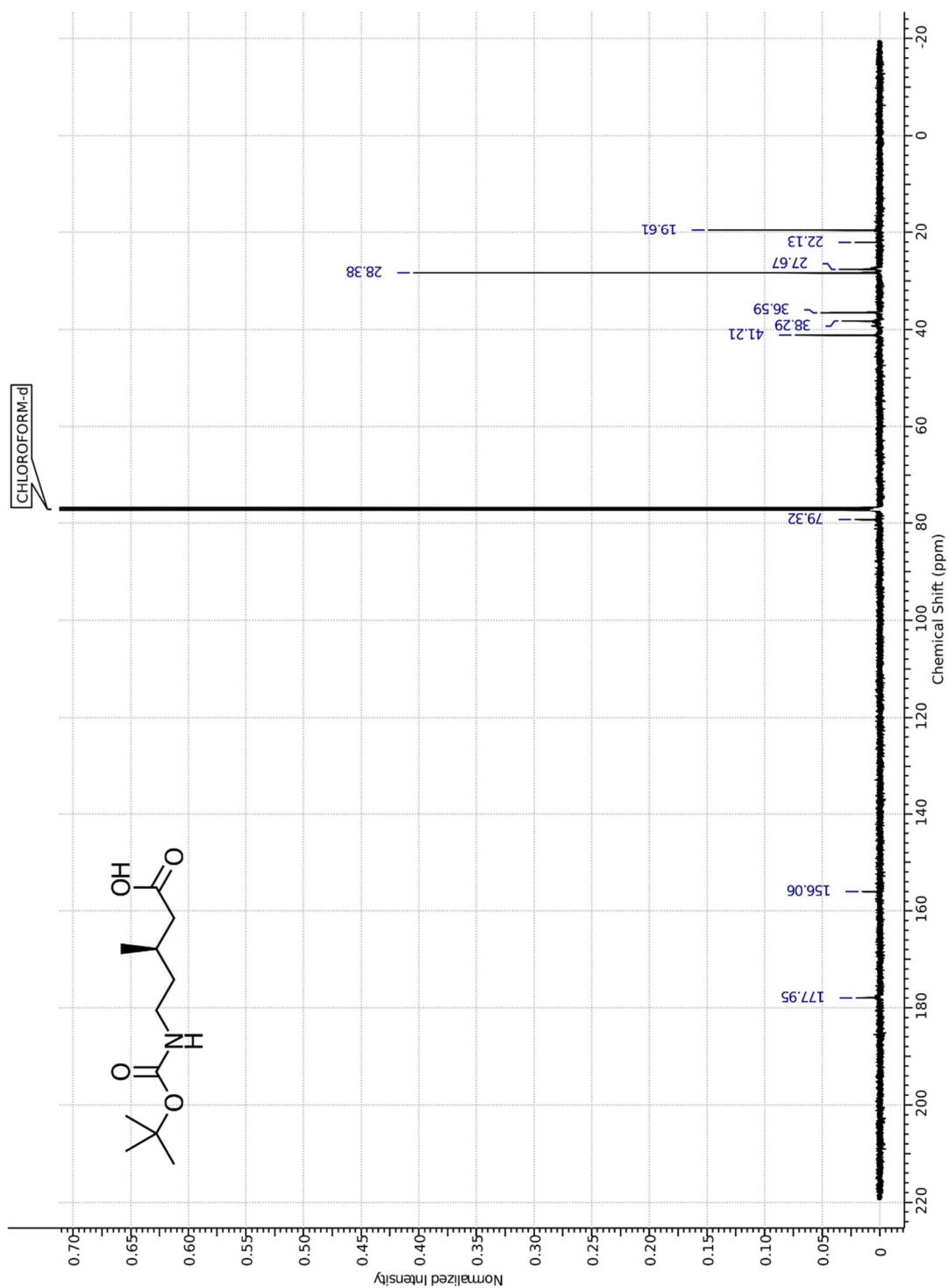


Methyl (3*R*)-3-methyl-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)valerate (18)

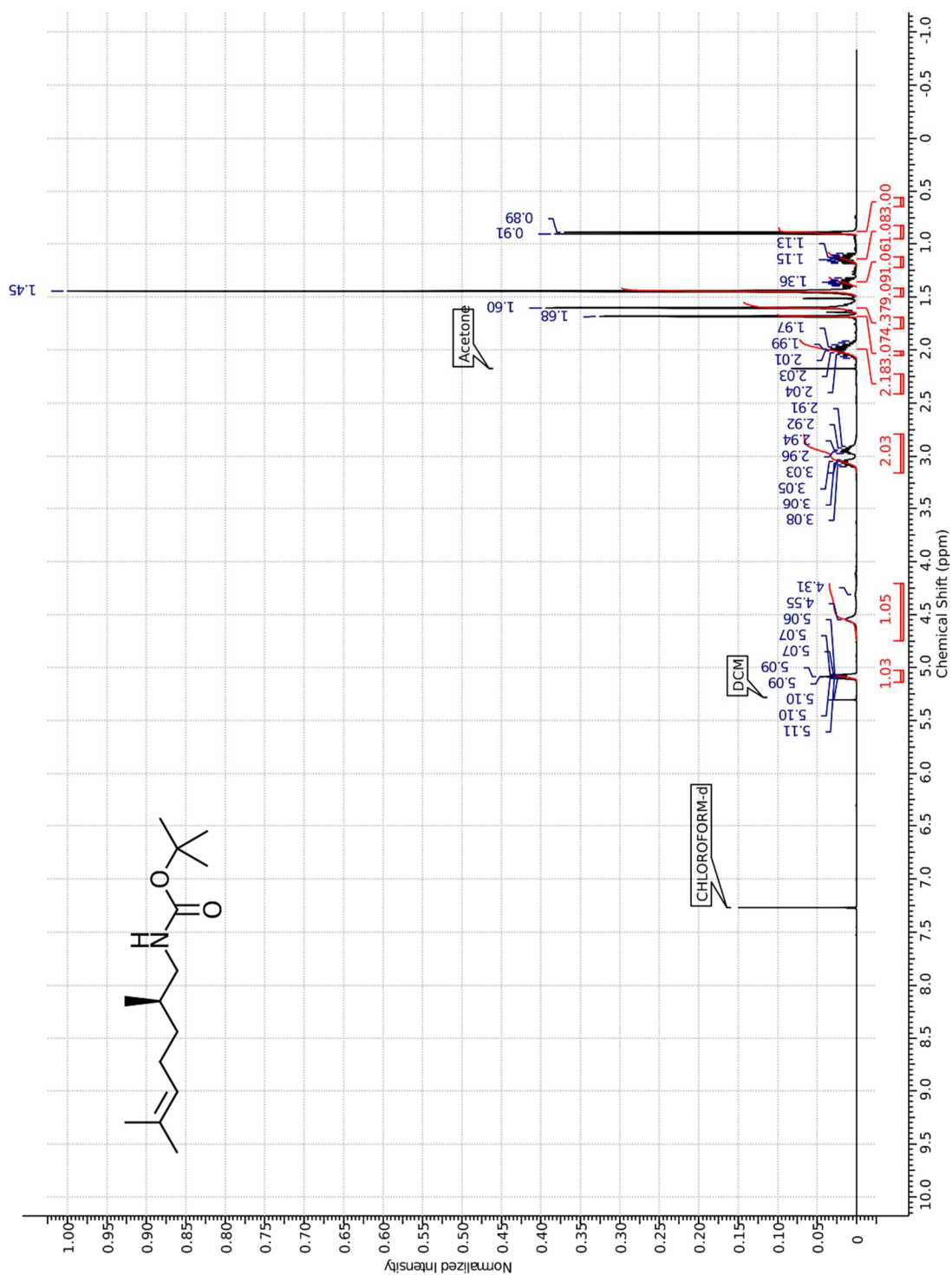


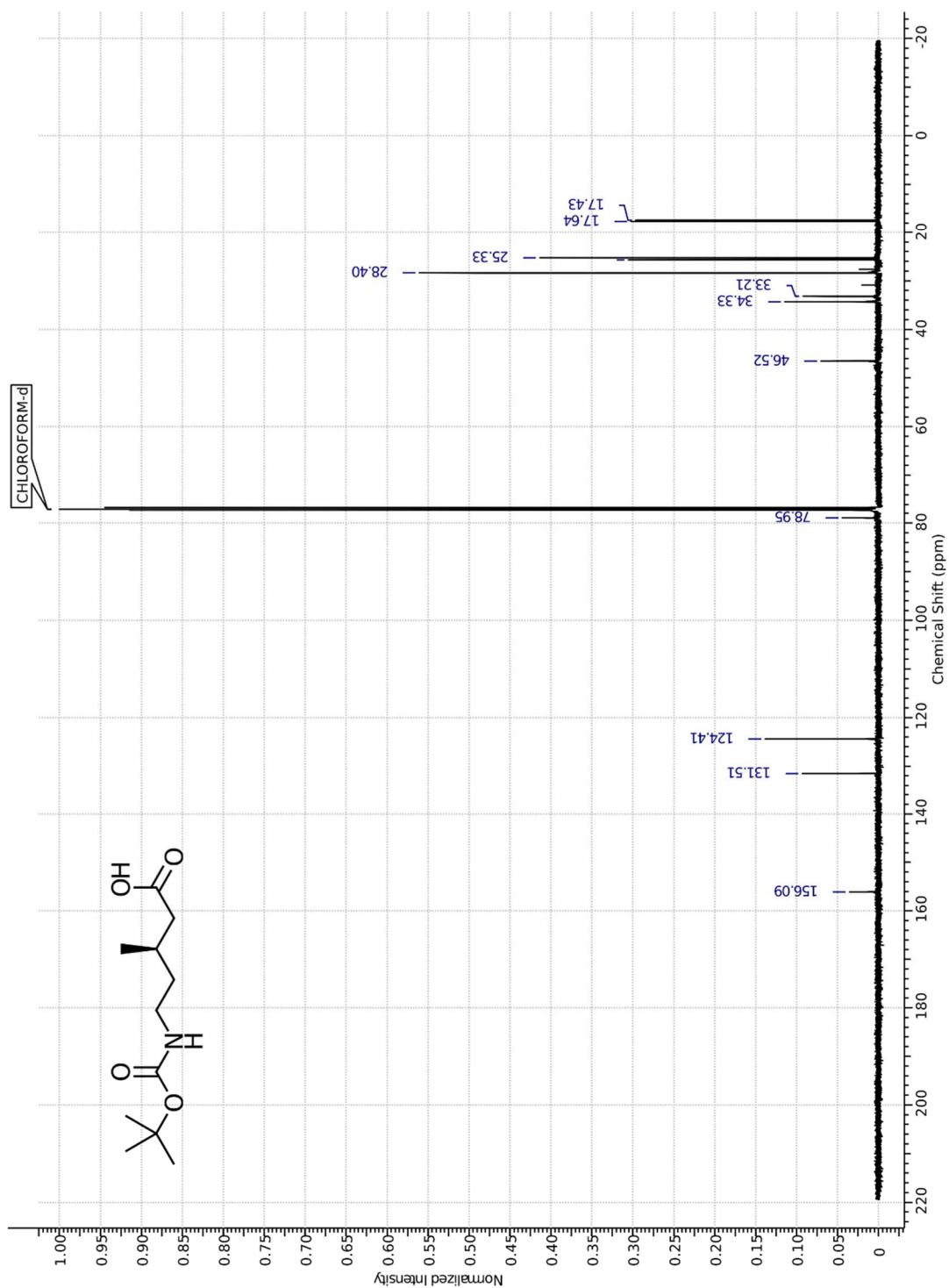
(3R)-3-Methyl-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)valeric acid (19)



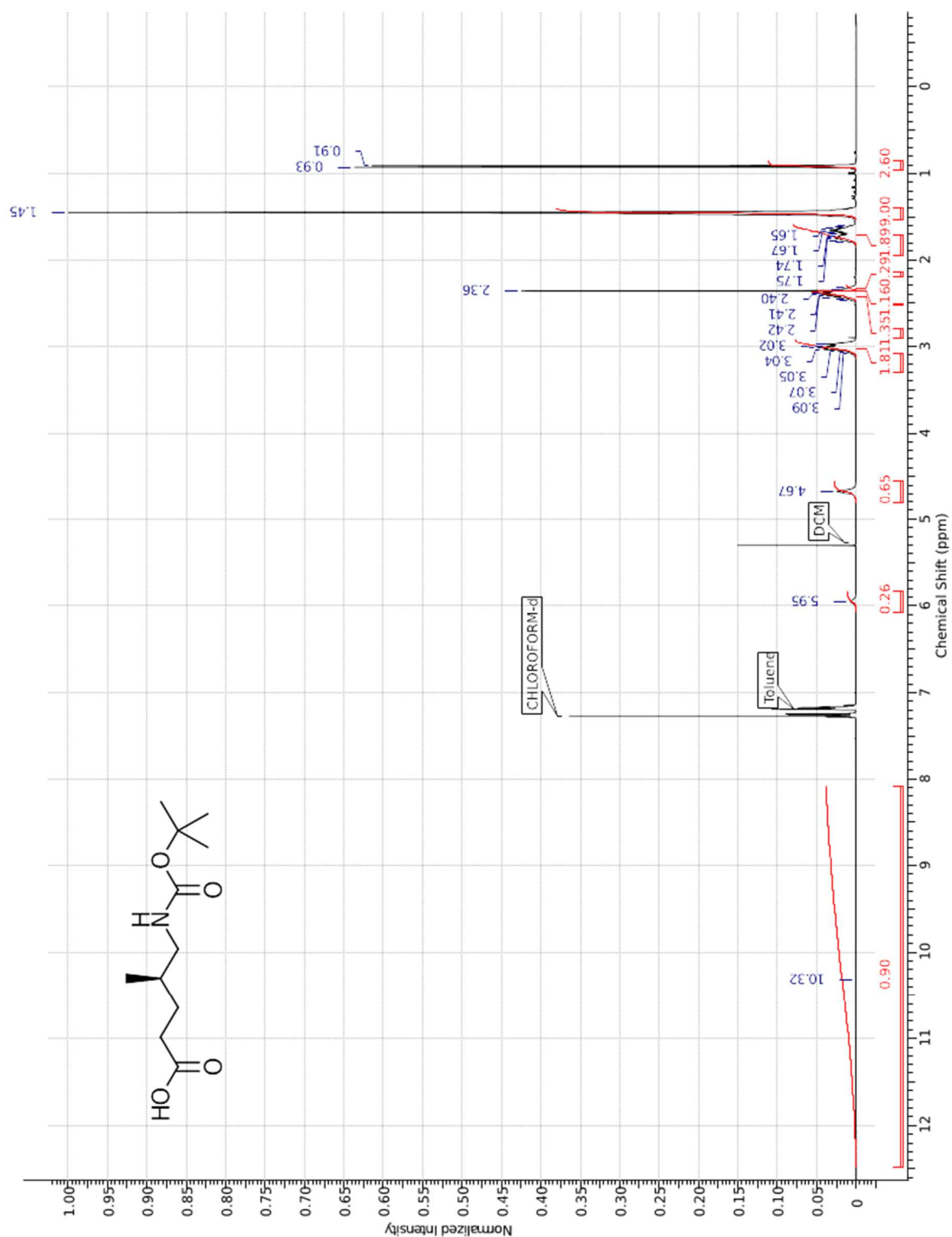


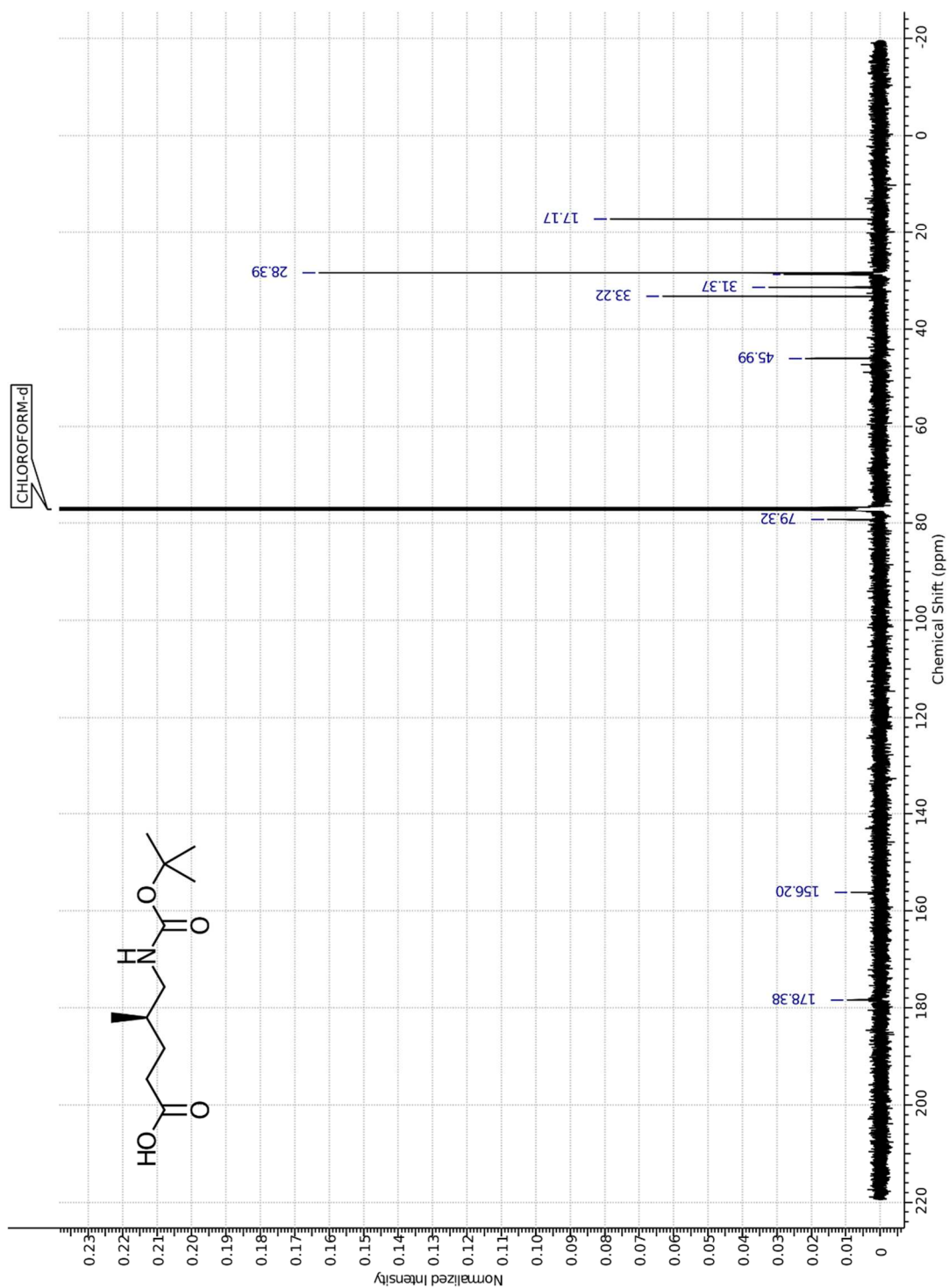
(2*R*)-2,6-Dimethyl-5-heptenylamino 2,2-dimethylpropionate (23)



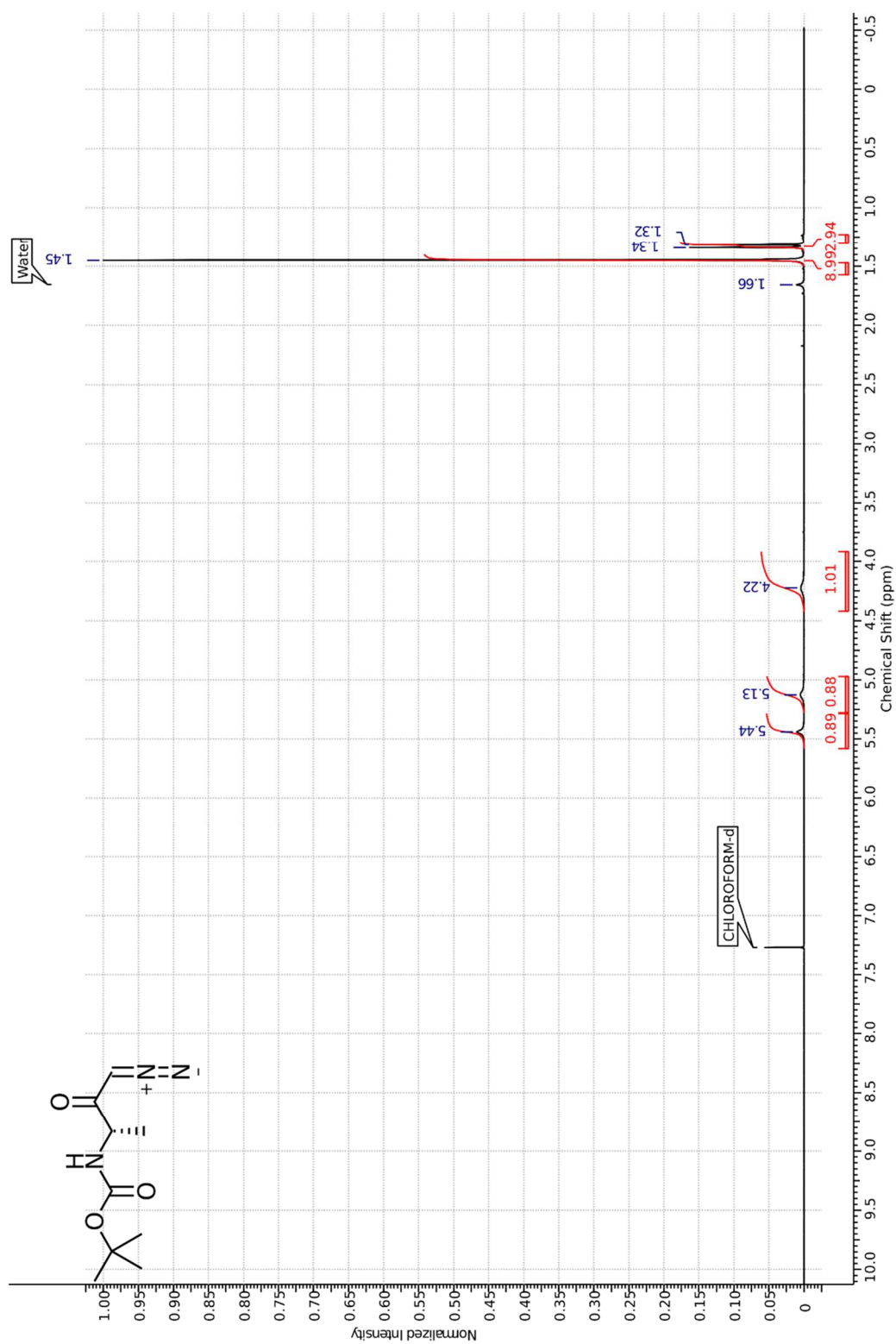


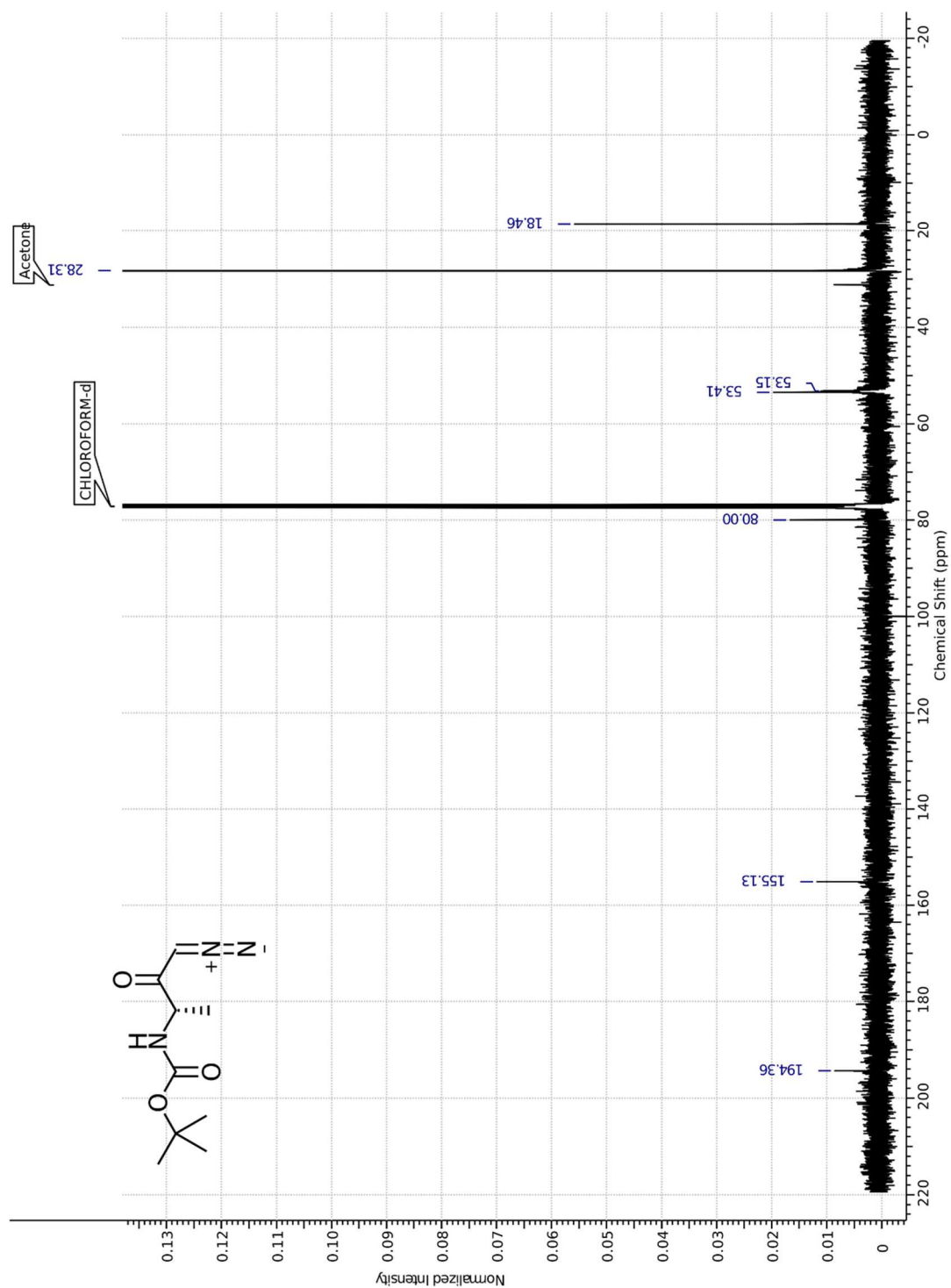
(4R)-4-Methyl-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)valeric acid (24)



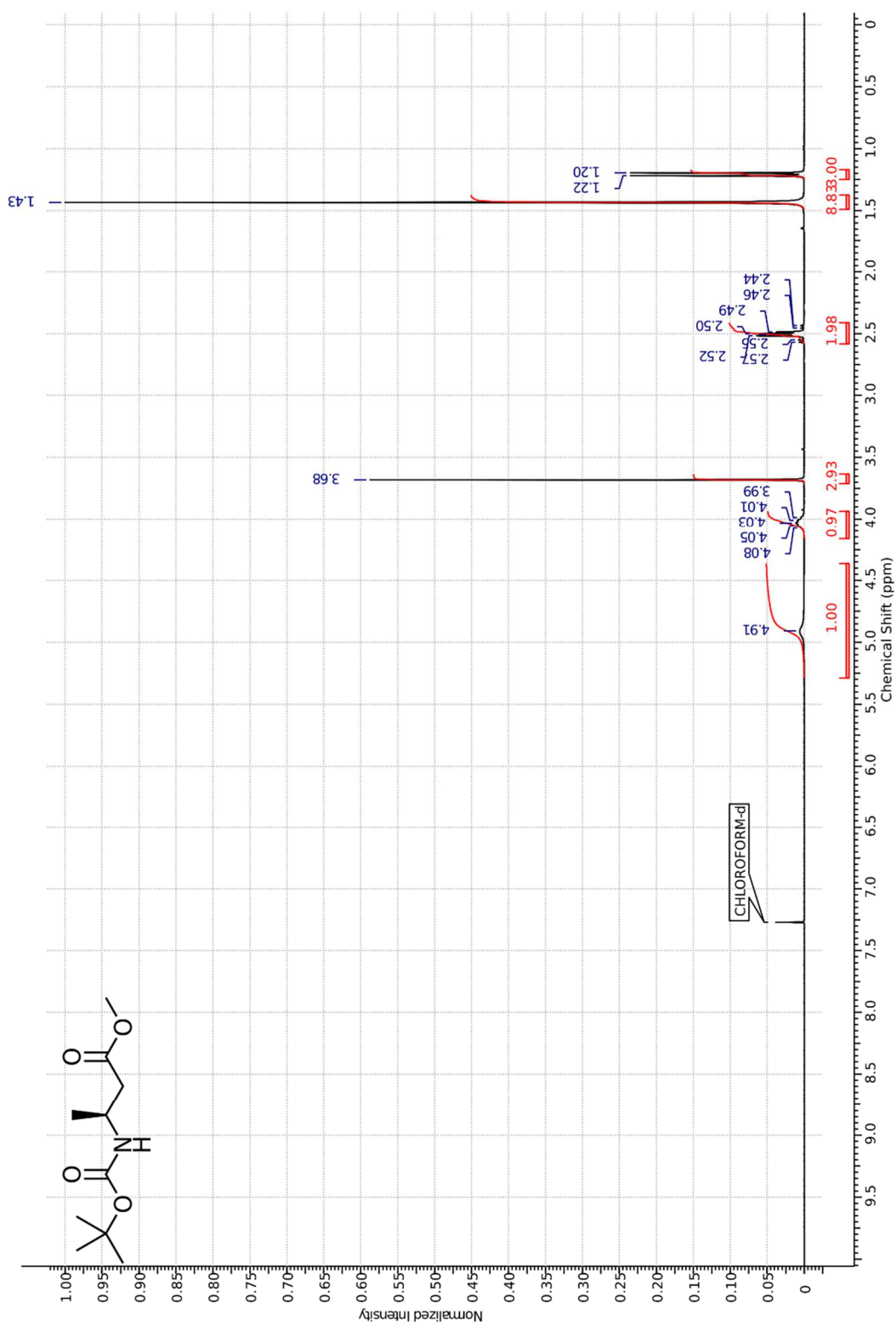


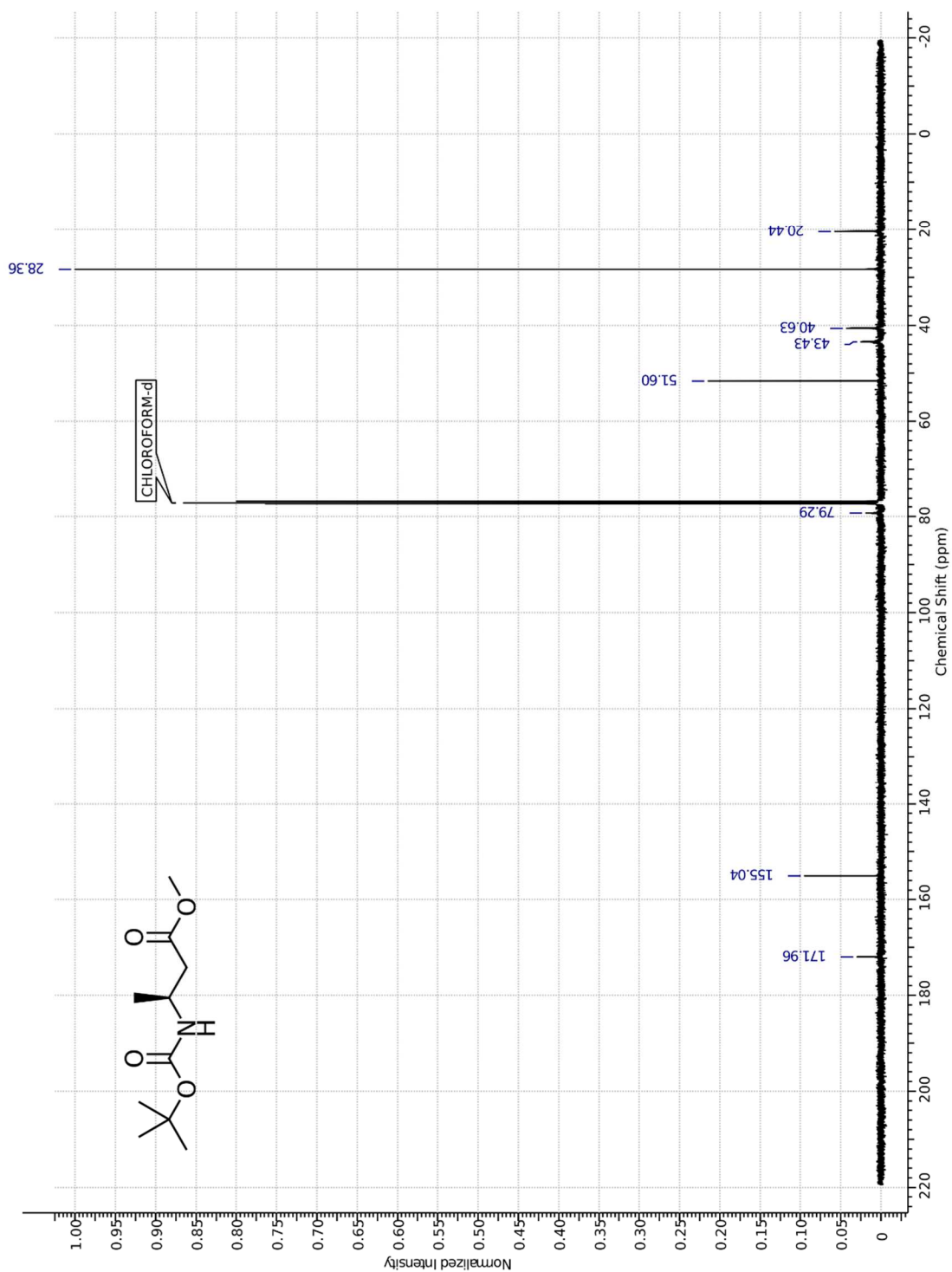
(1*S*)-3-Diazo-1-methyl-2-oxopropylamino 2,2-dimethylpropionate (26)



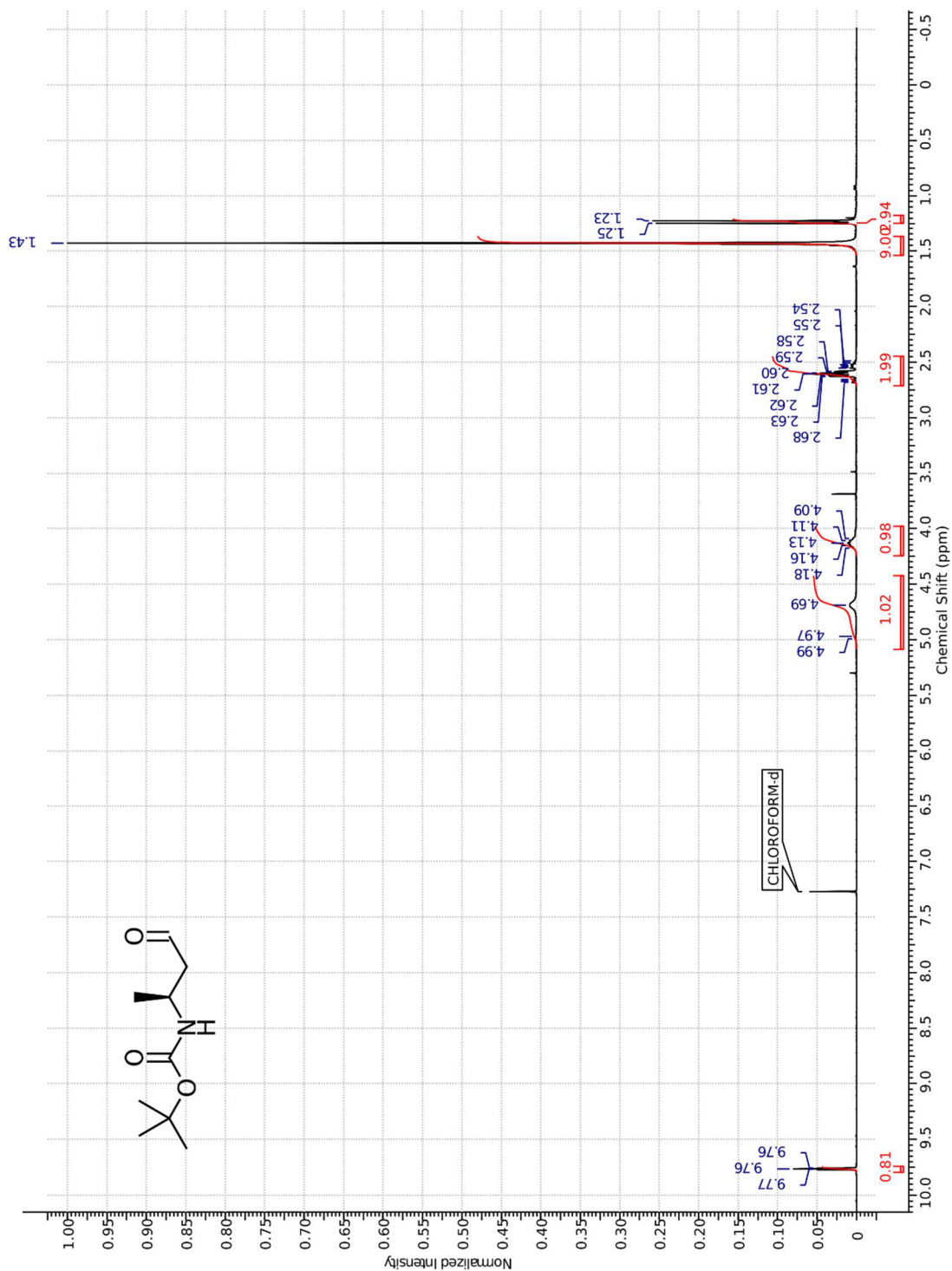


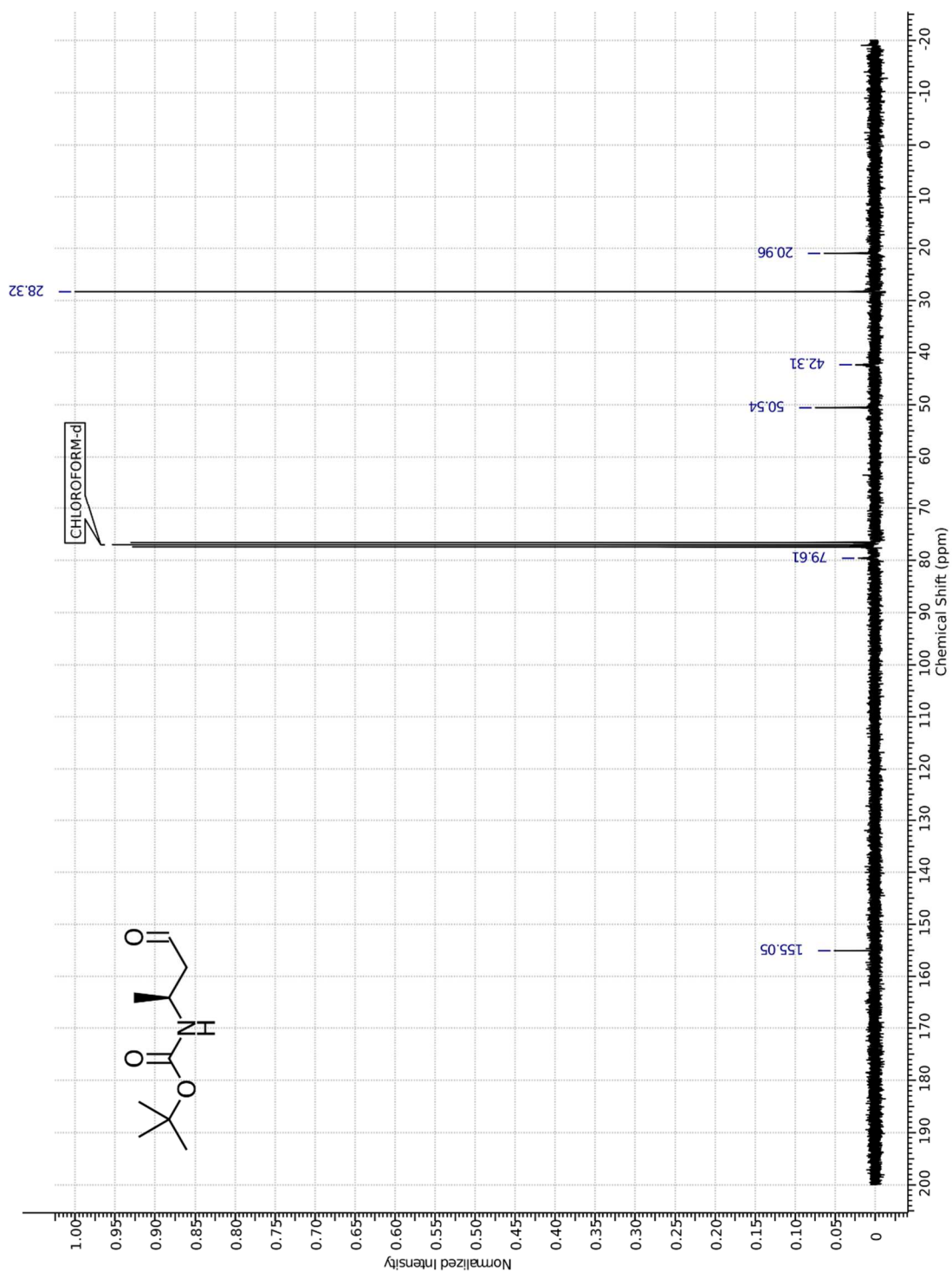
Methyl (3*S*)-3-(*tert*-butoxycarbonylamino)butyrate (27)



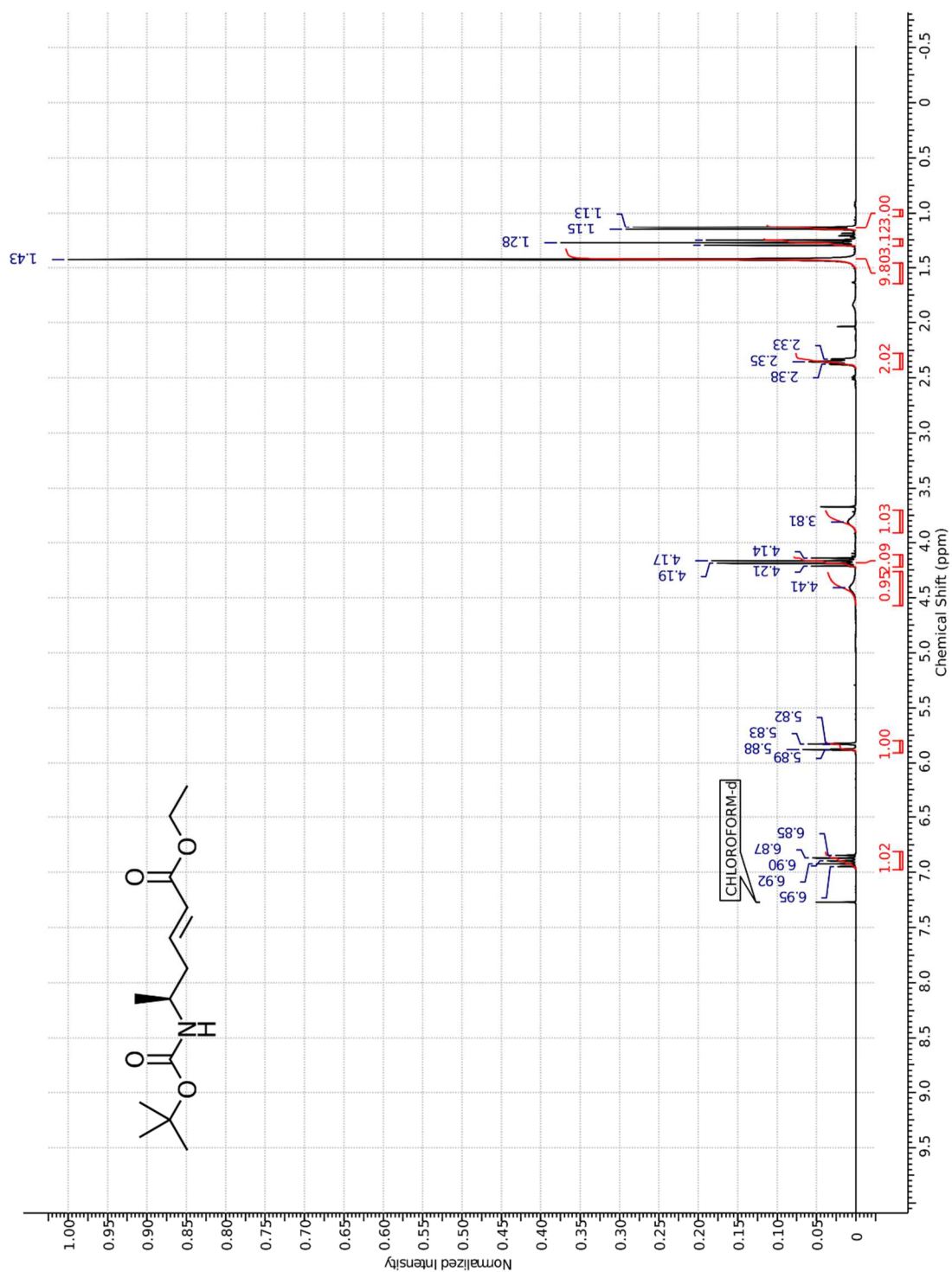


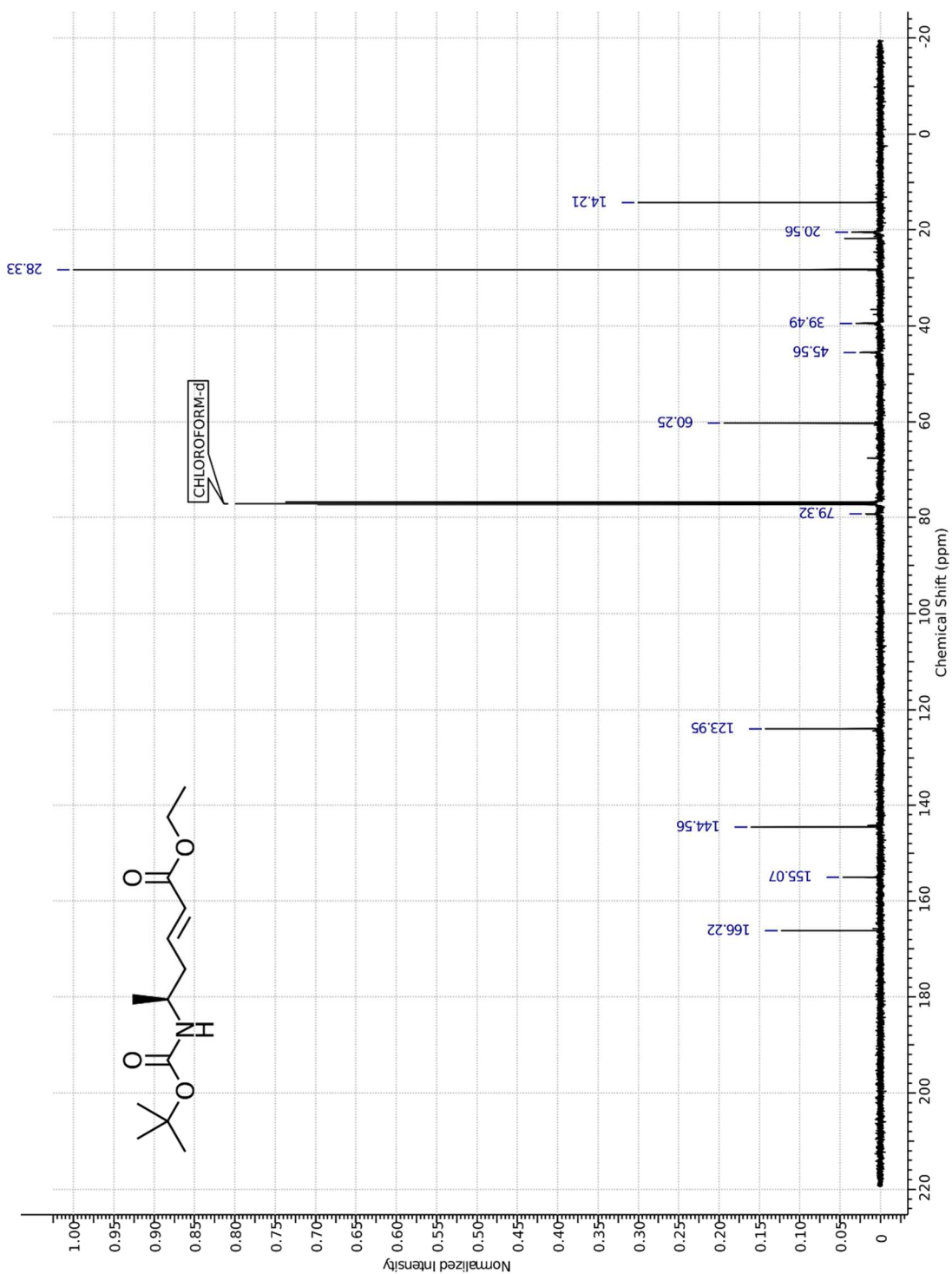
(1S)-2-Formyl-1-methylethylamino 2,2-dimethylpropionate (28)



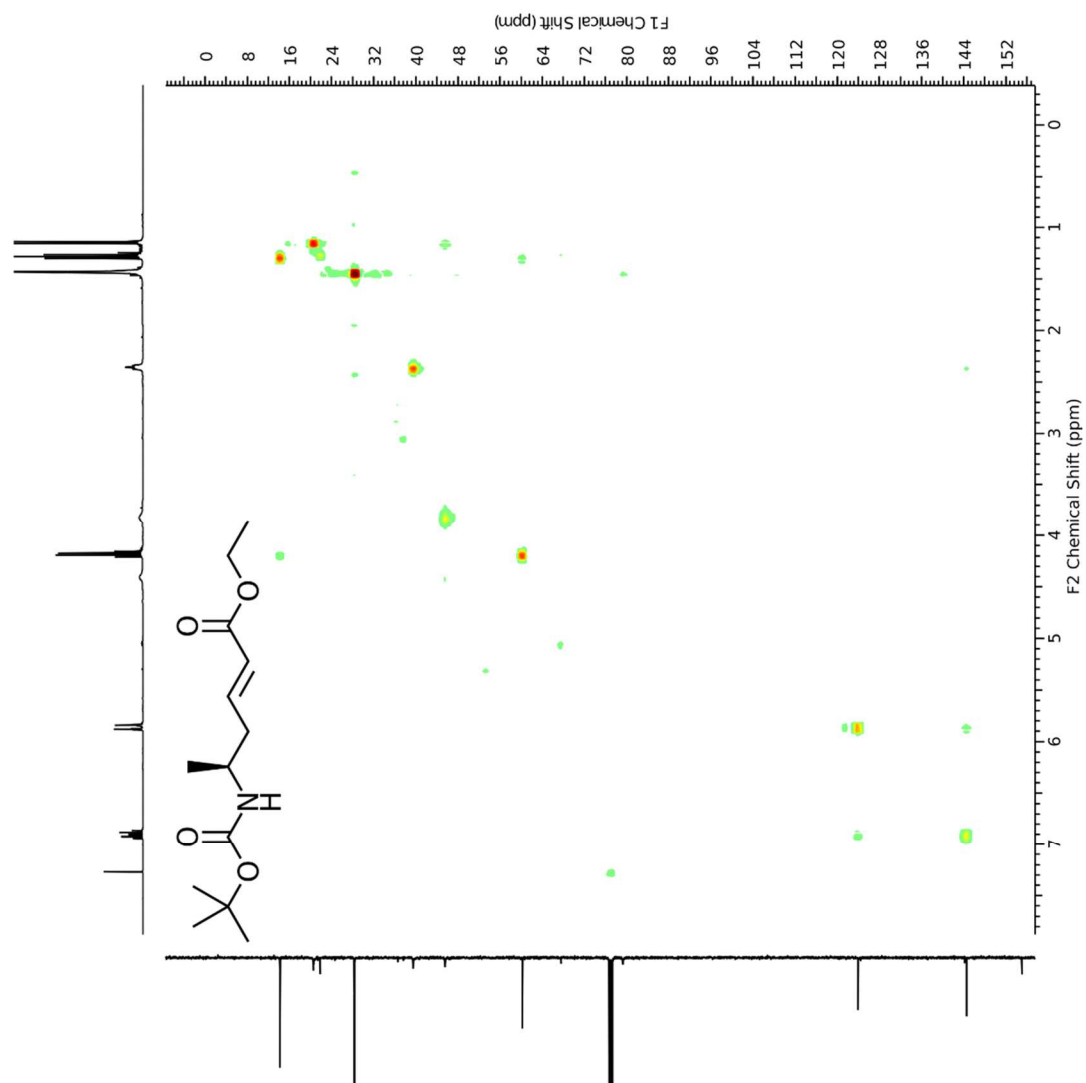


Ethyl (5*S*,*E*)-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)-2-hexenoate (29)

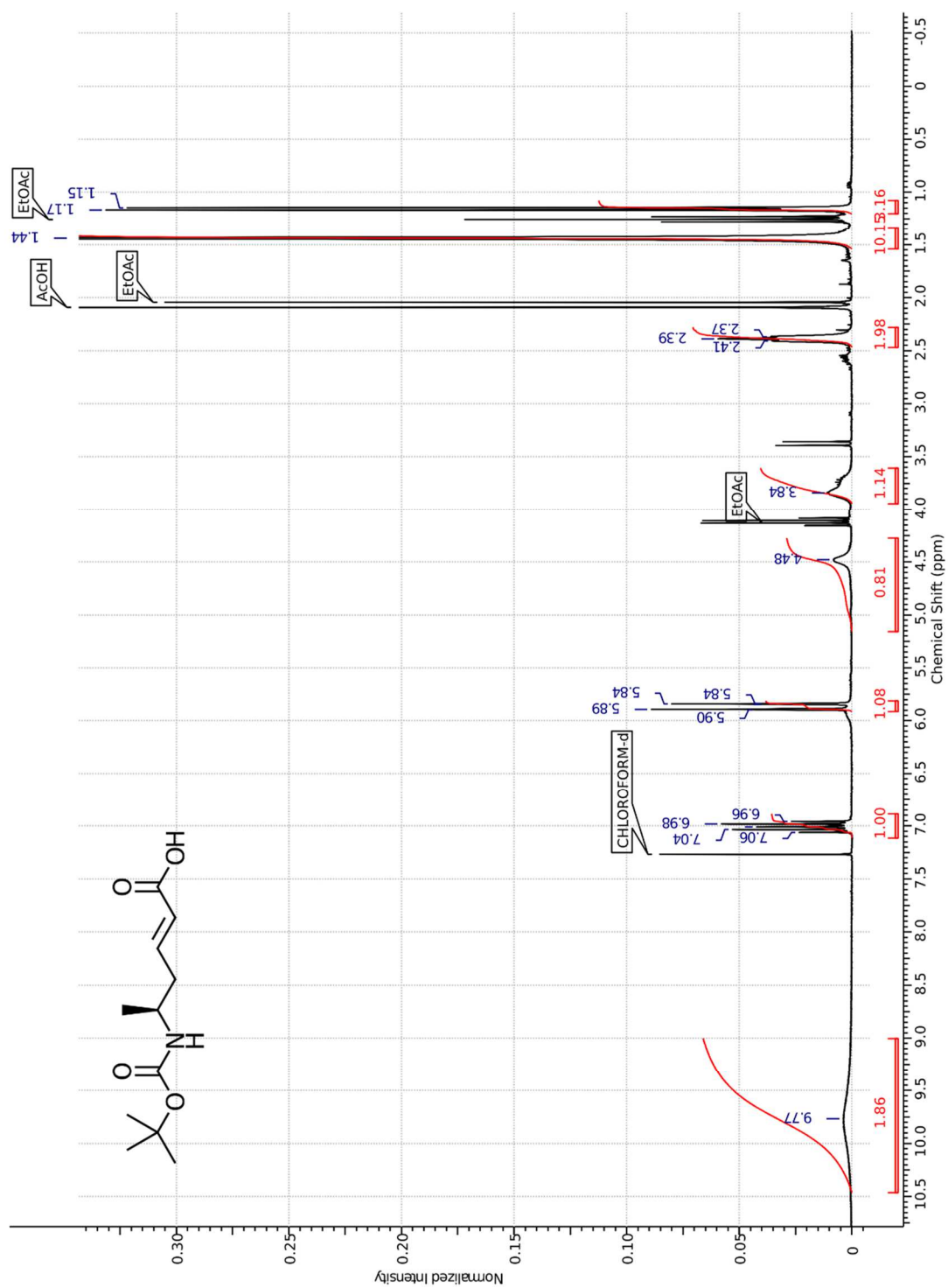




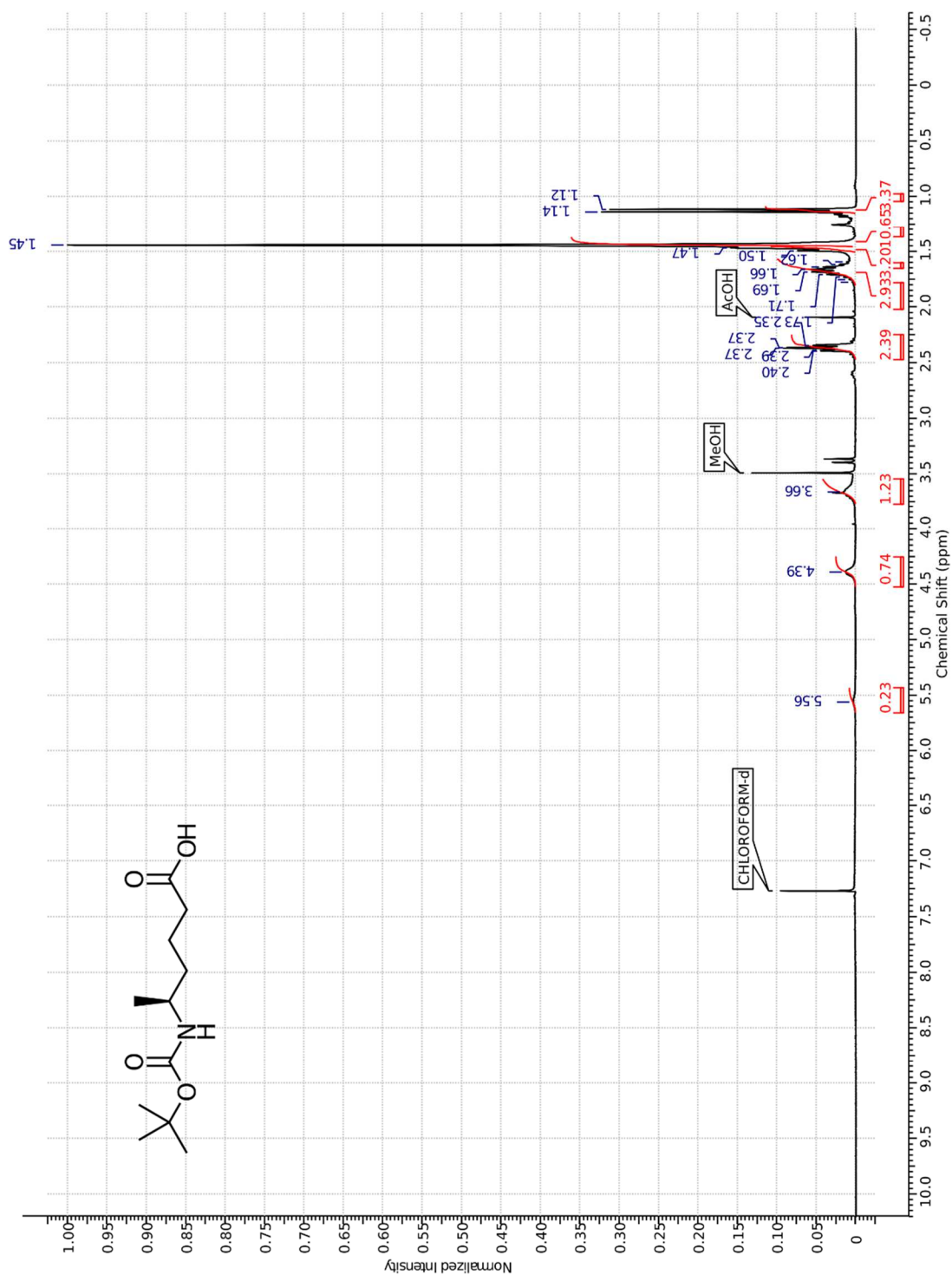
HSQC

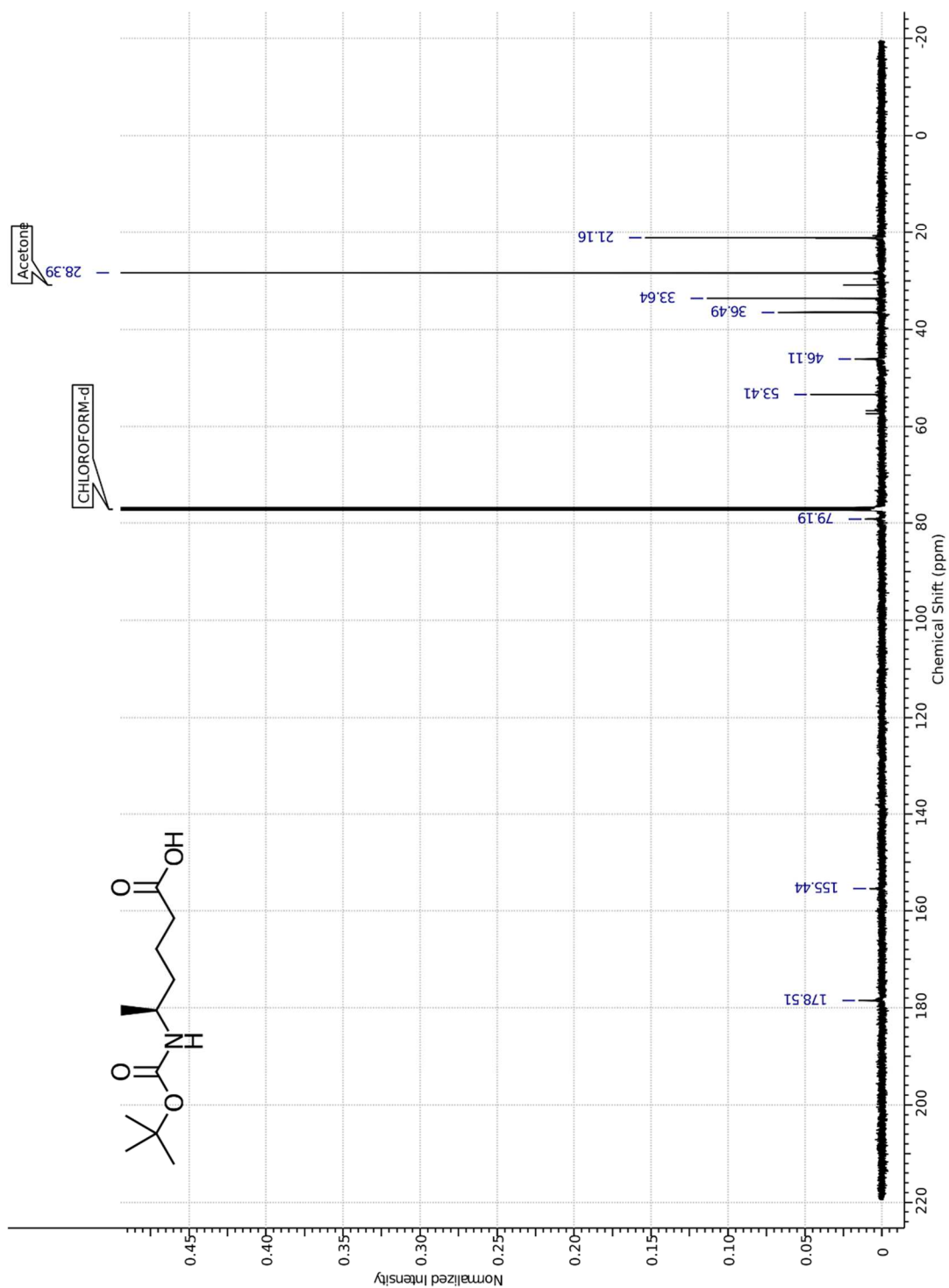


(5*S*,*E*)-5-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-2-hexenoic acid (30)

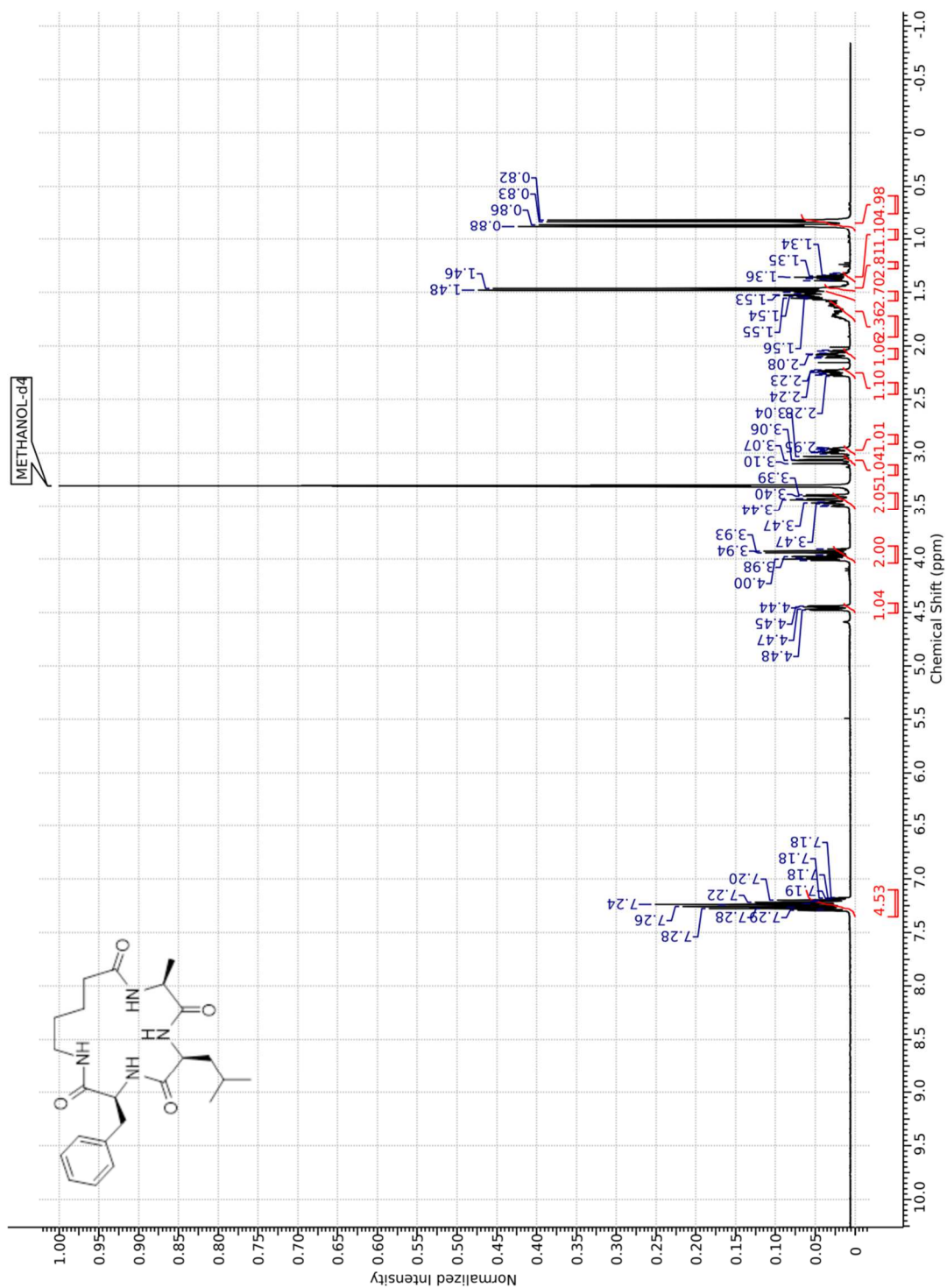


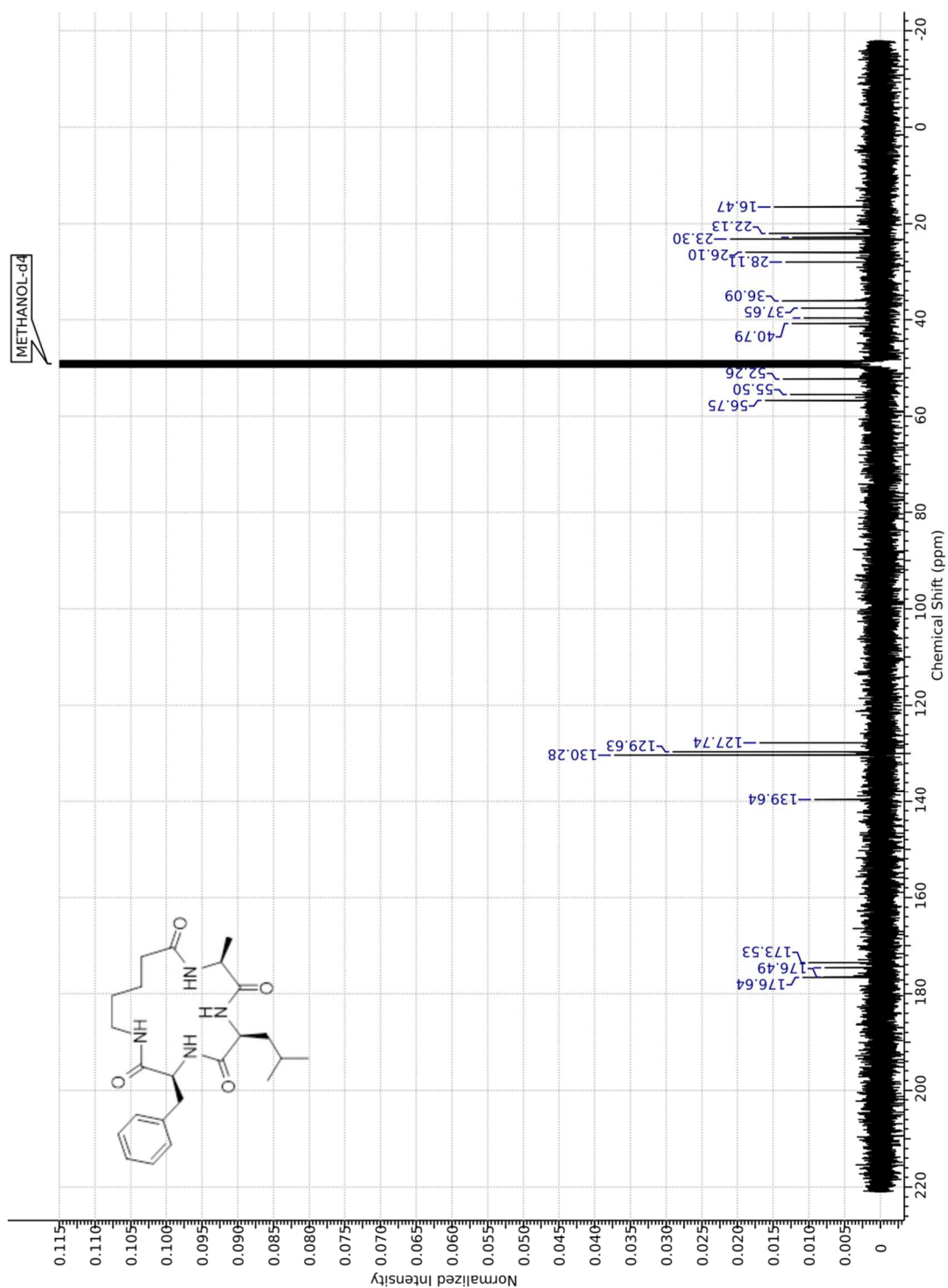
(5S)-5-(tert-Butoxycarbonylamino)hexanoic acid (31)



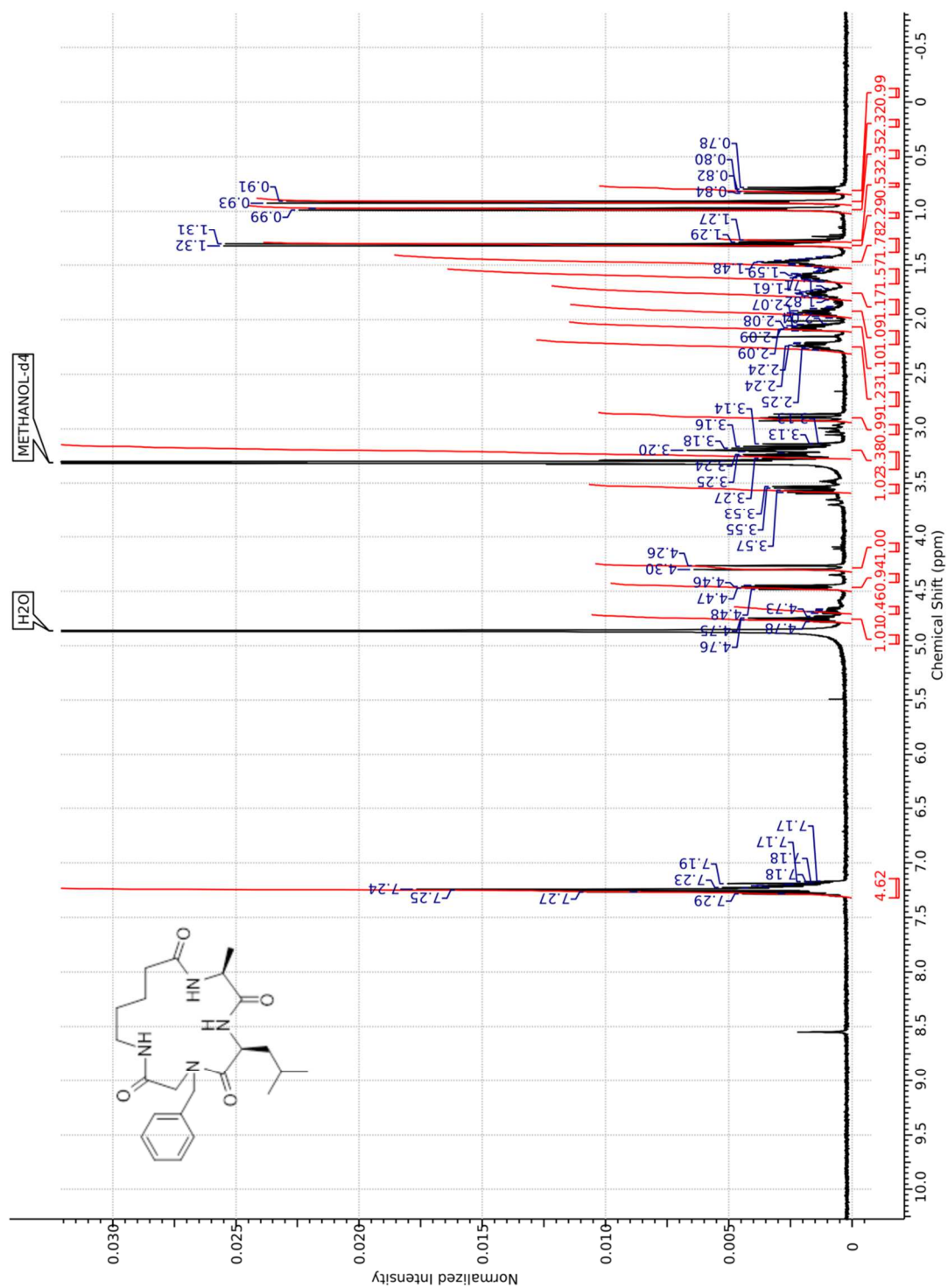


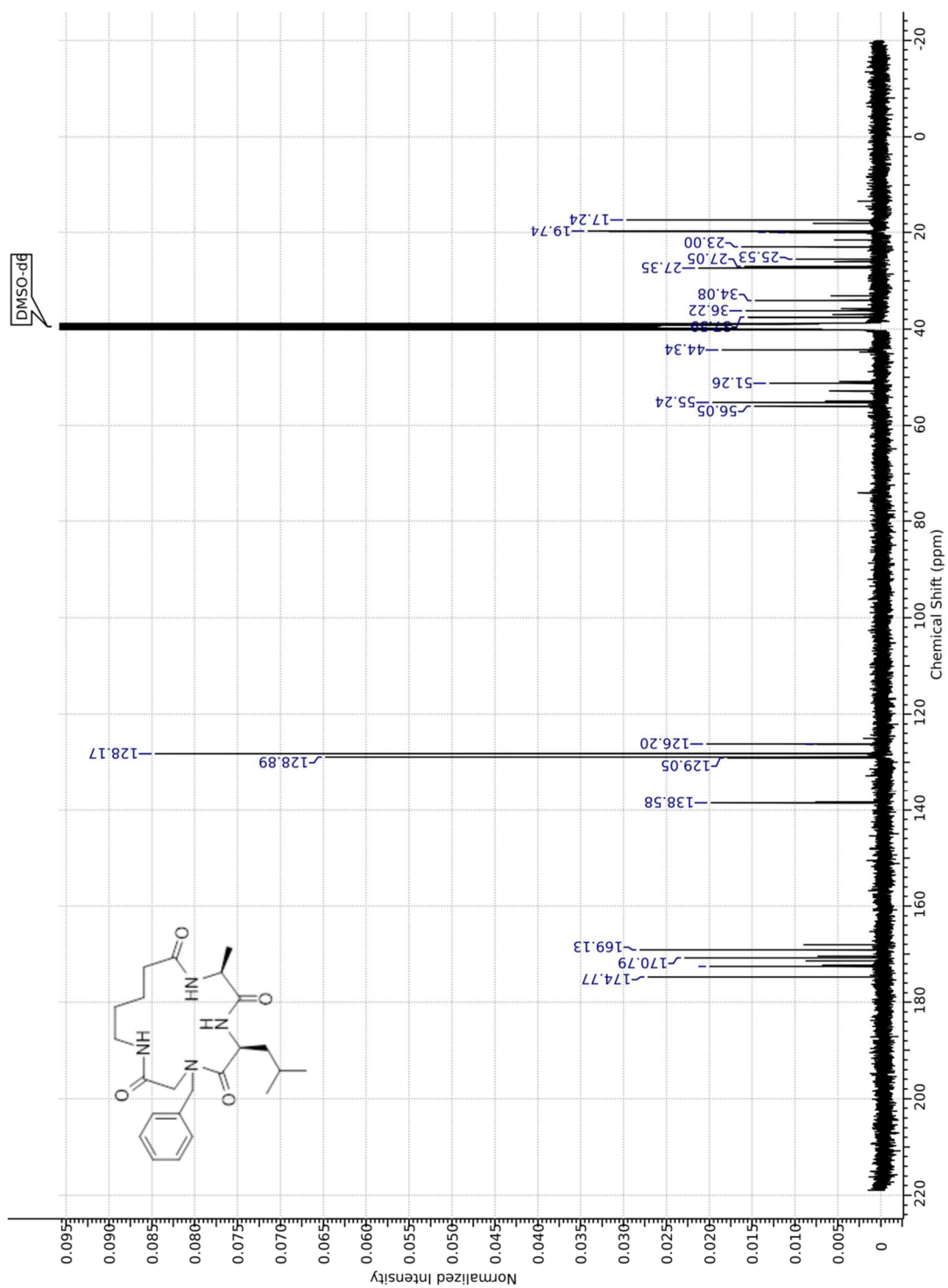
(3*S*,6*S*,9*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Ø-Ø) (32)



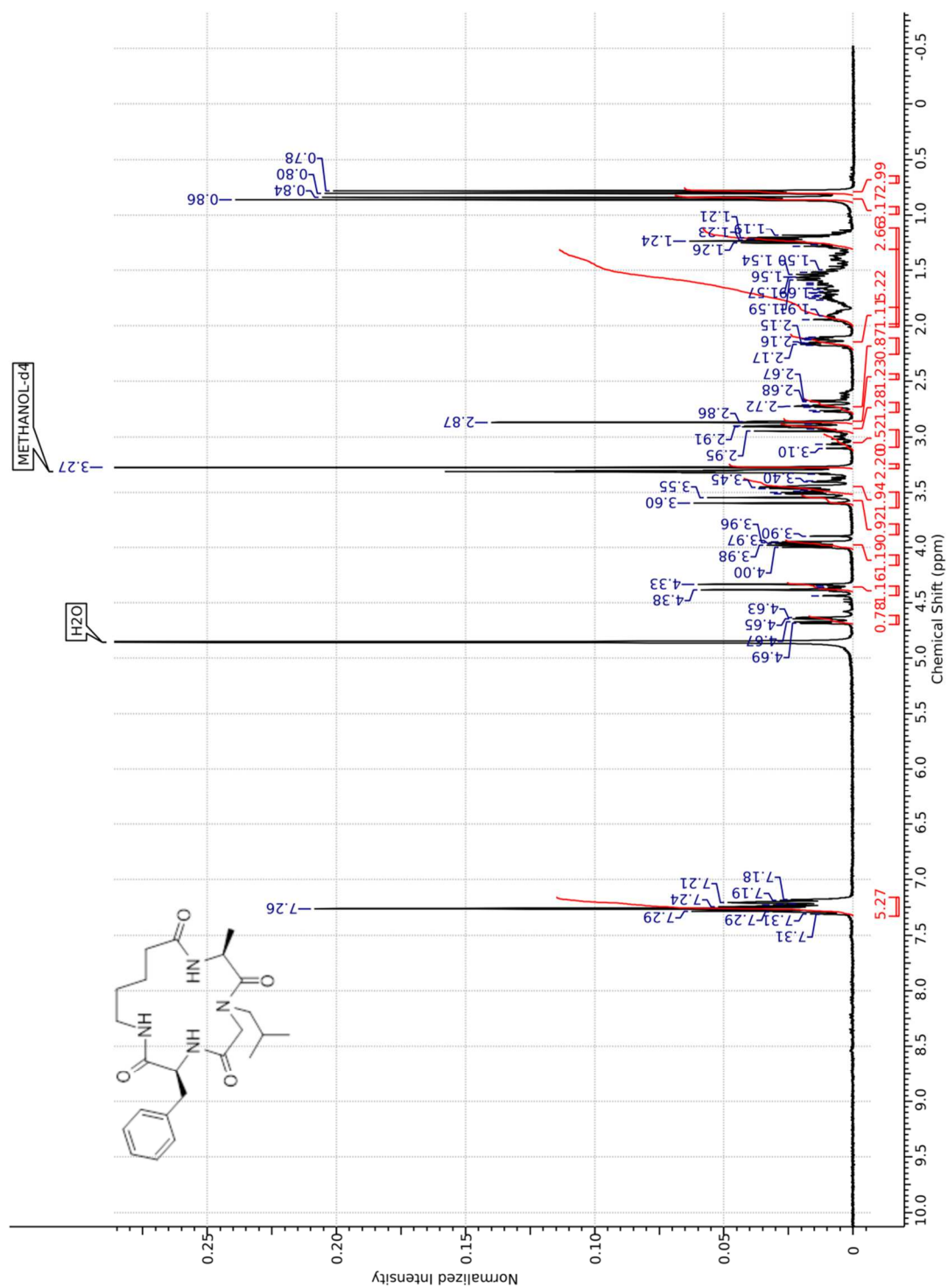


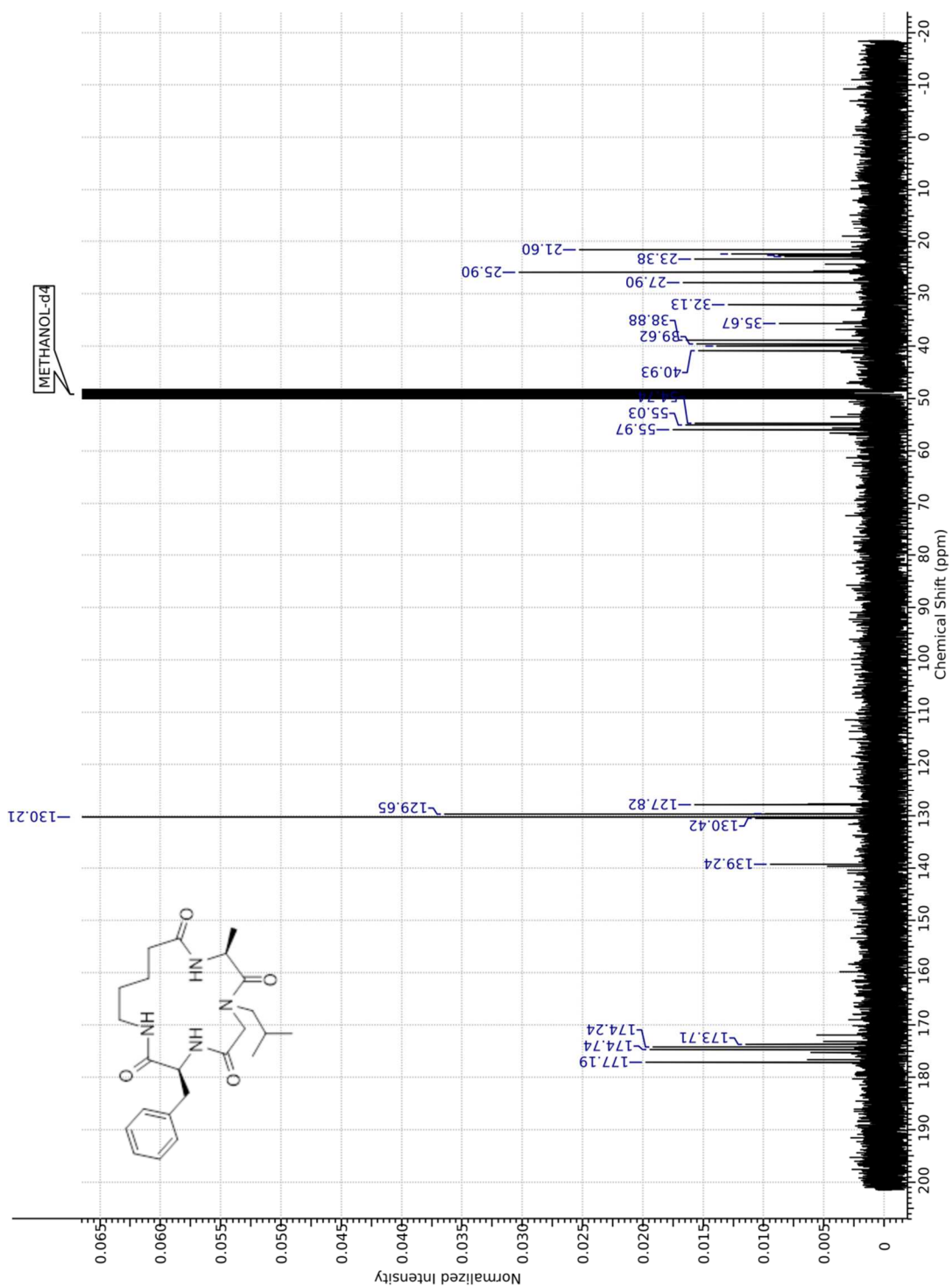
(6*S*,9*S*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Nphe-Ø) (33)



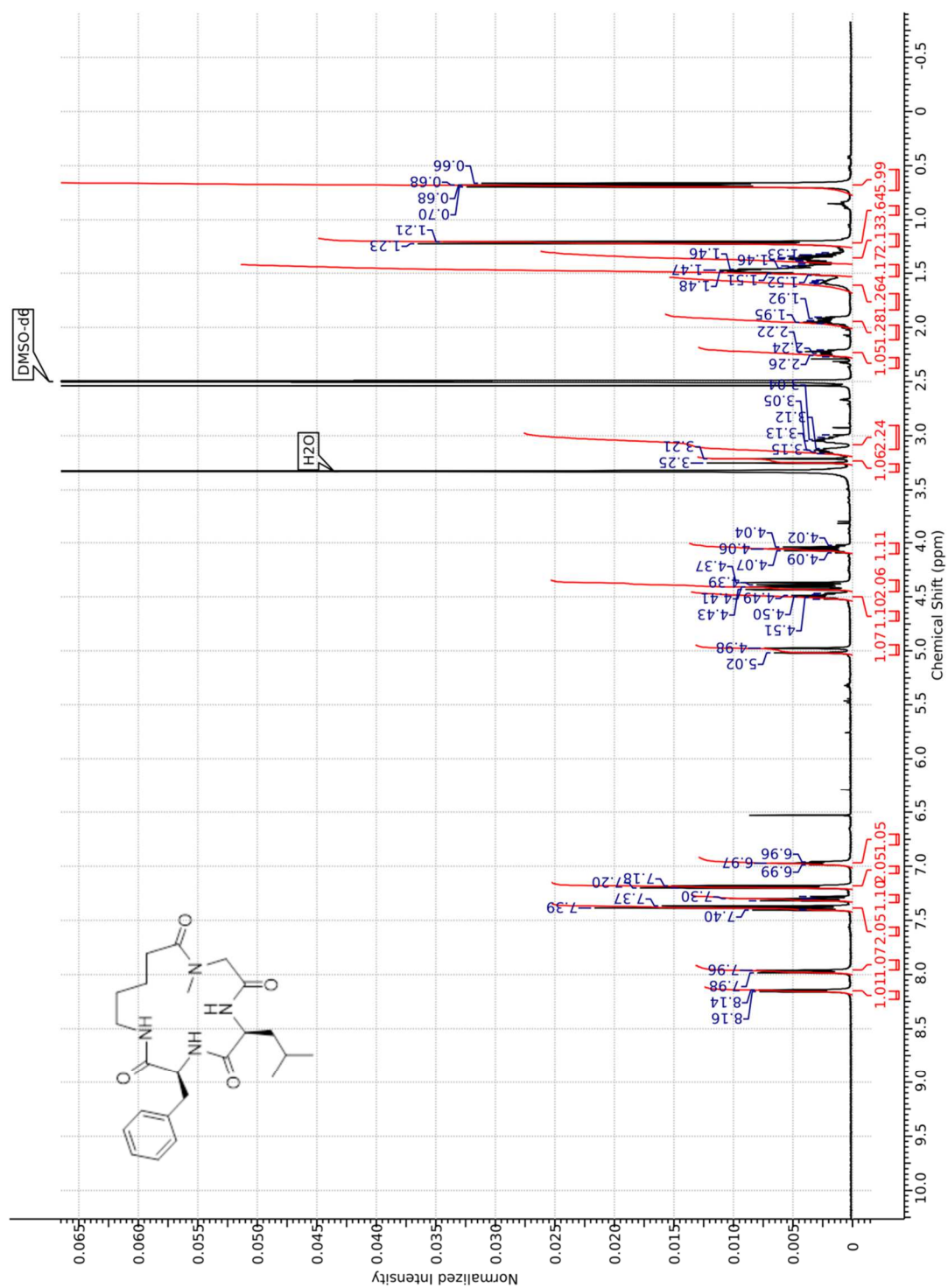


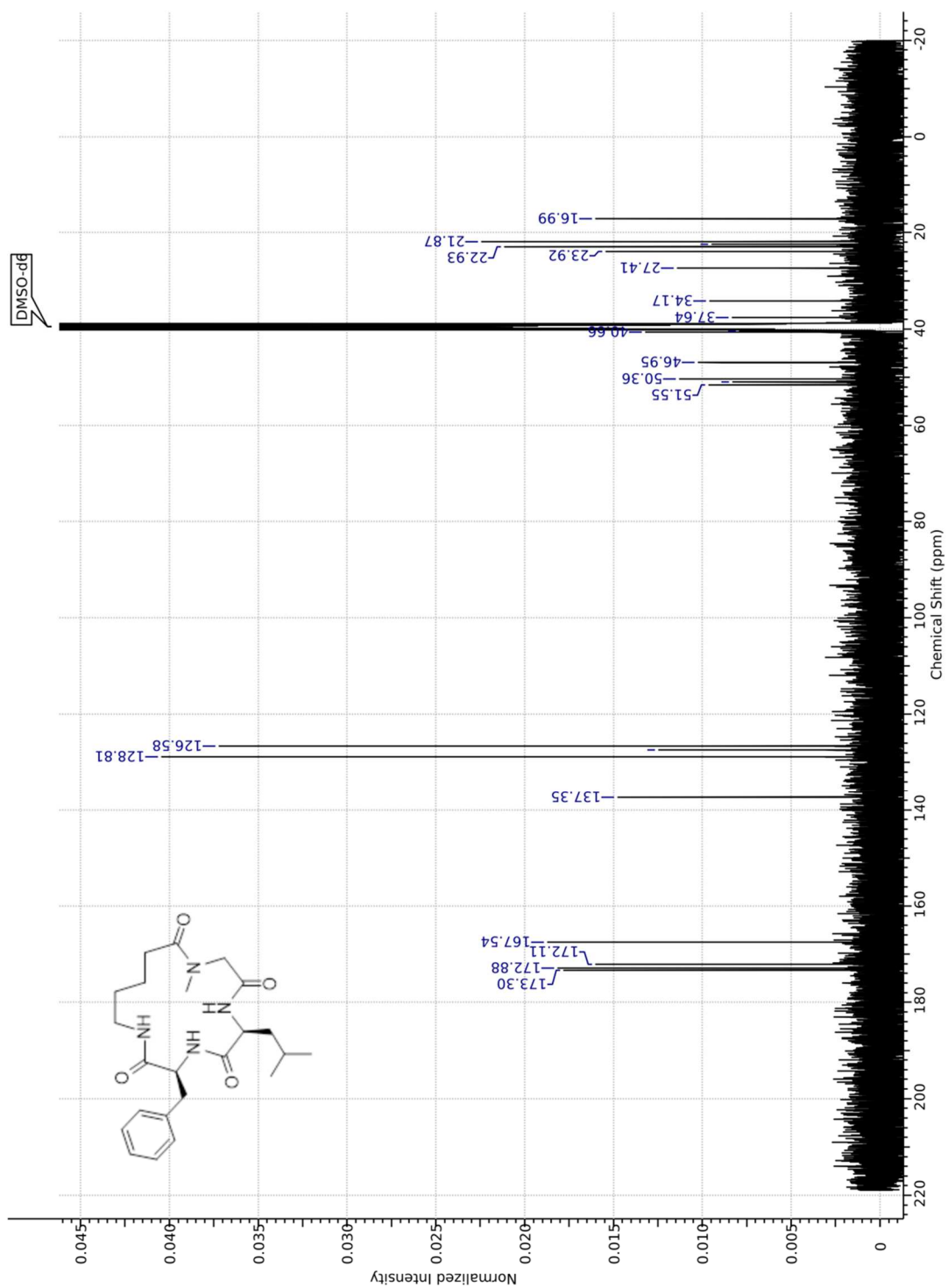
(3*S*,9*S*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Nleu-Ø) (34)



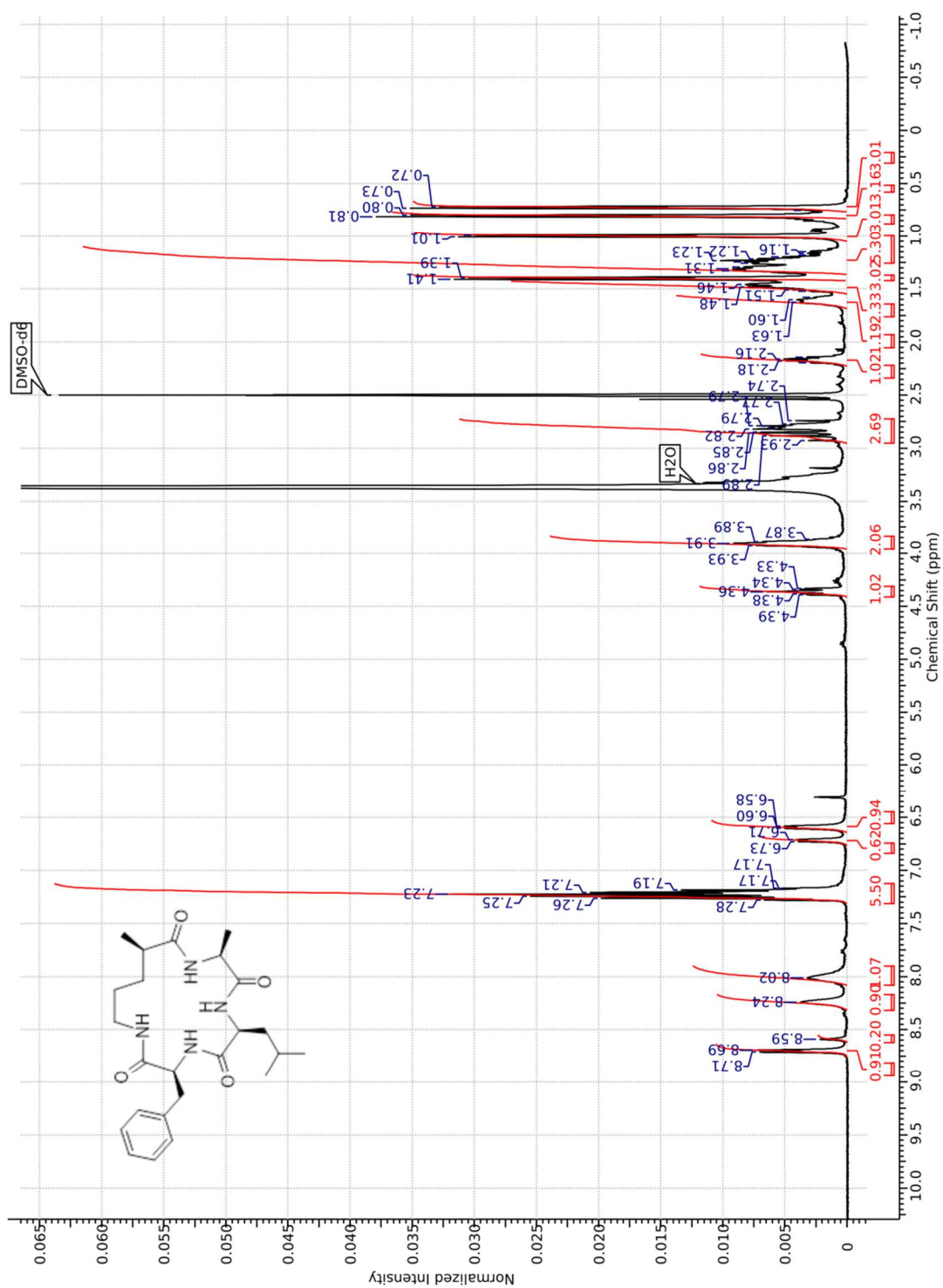


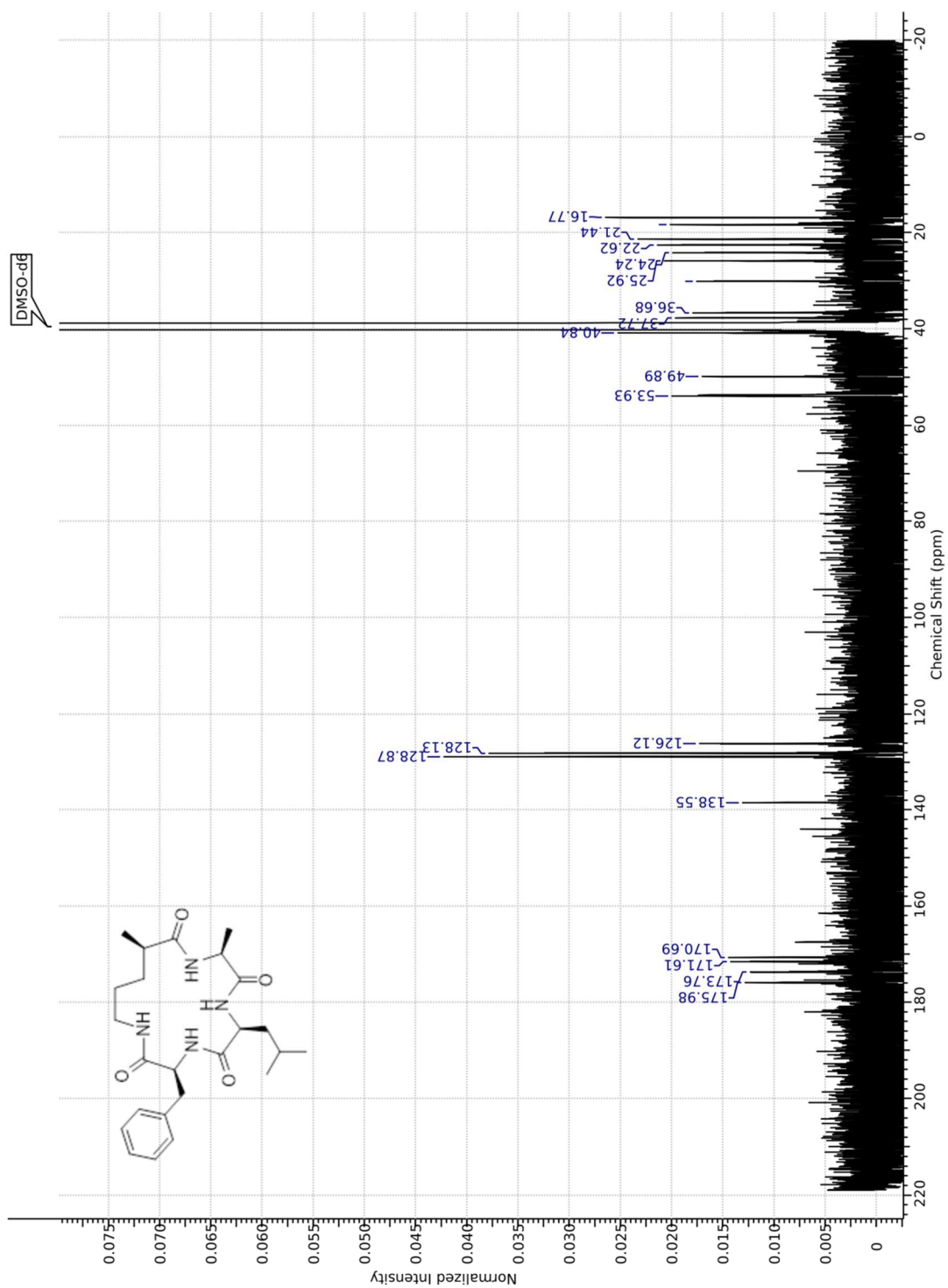
(3S,6S)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nala-Ø) (35)



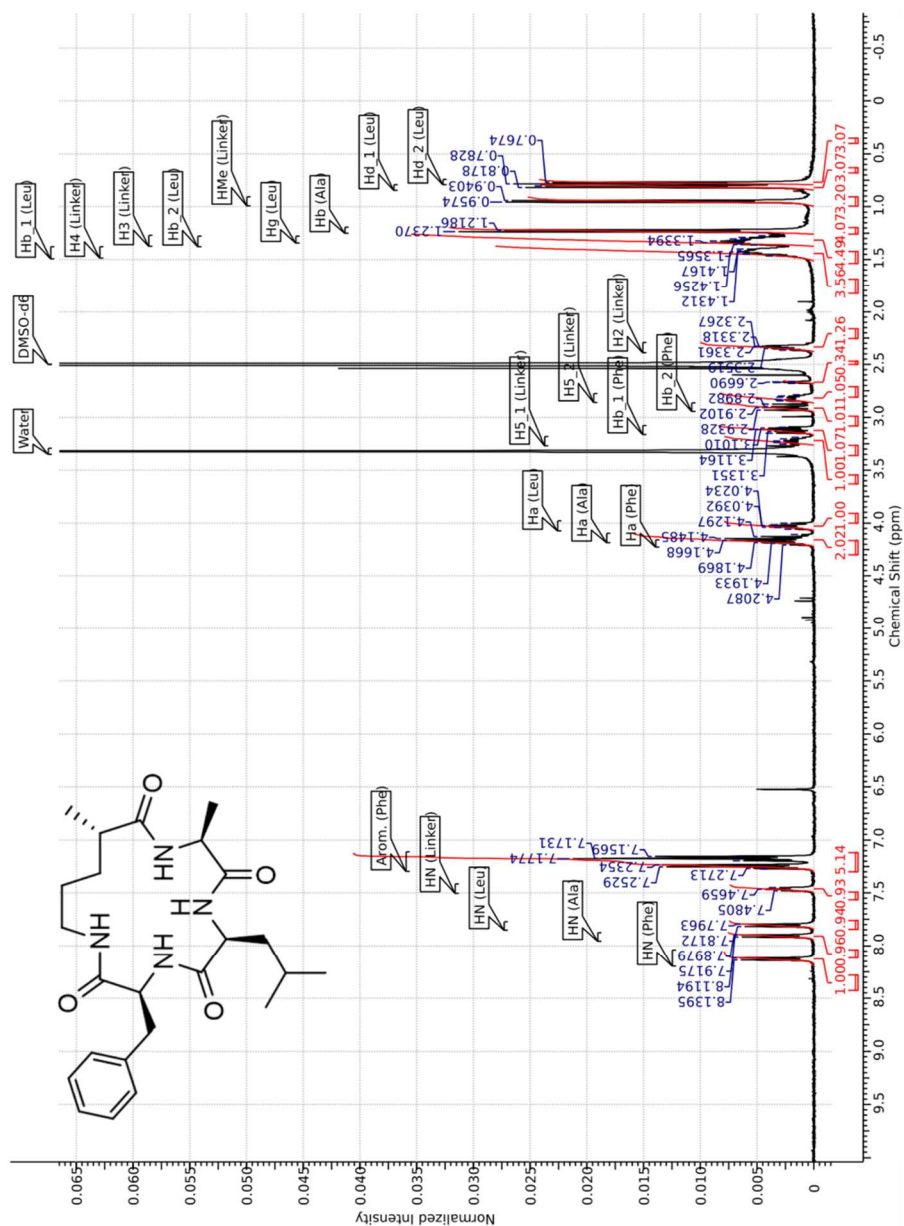


(3*S*,6*S*,9*S*,12*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,12-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Ø-2R) (36)

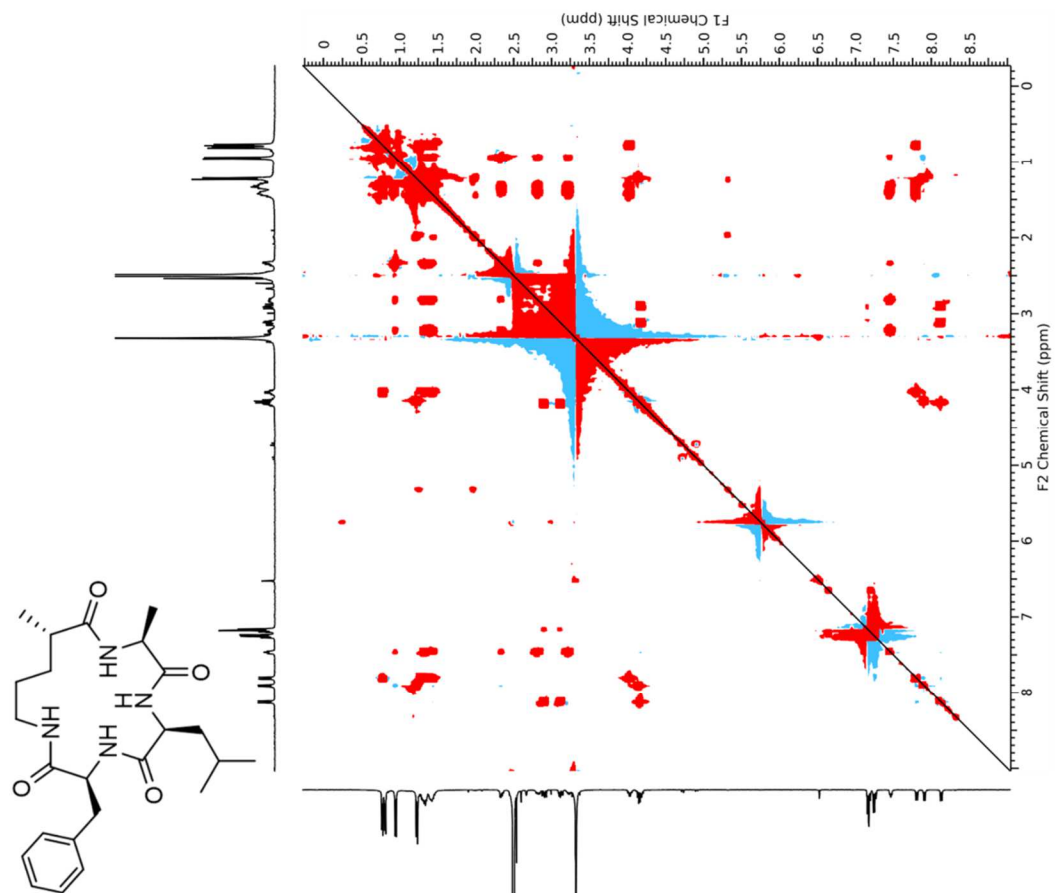




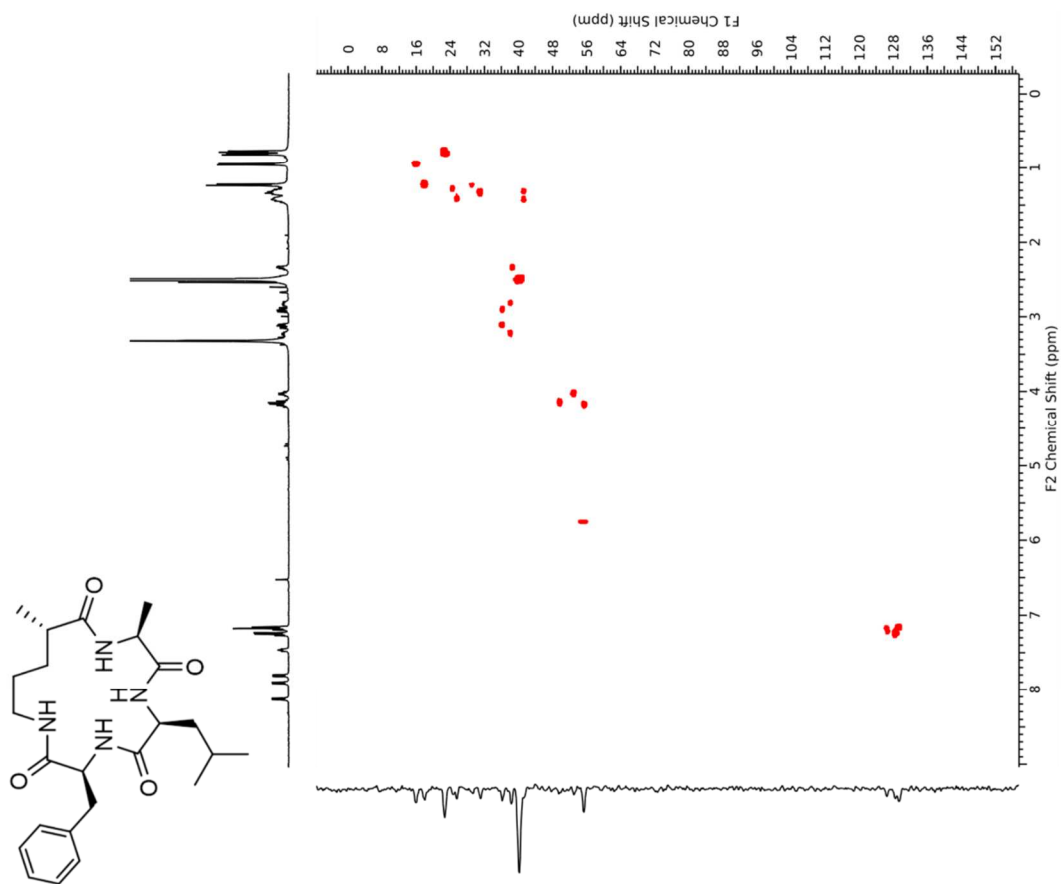
DMSO - ^1H



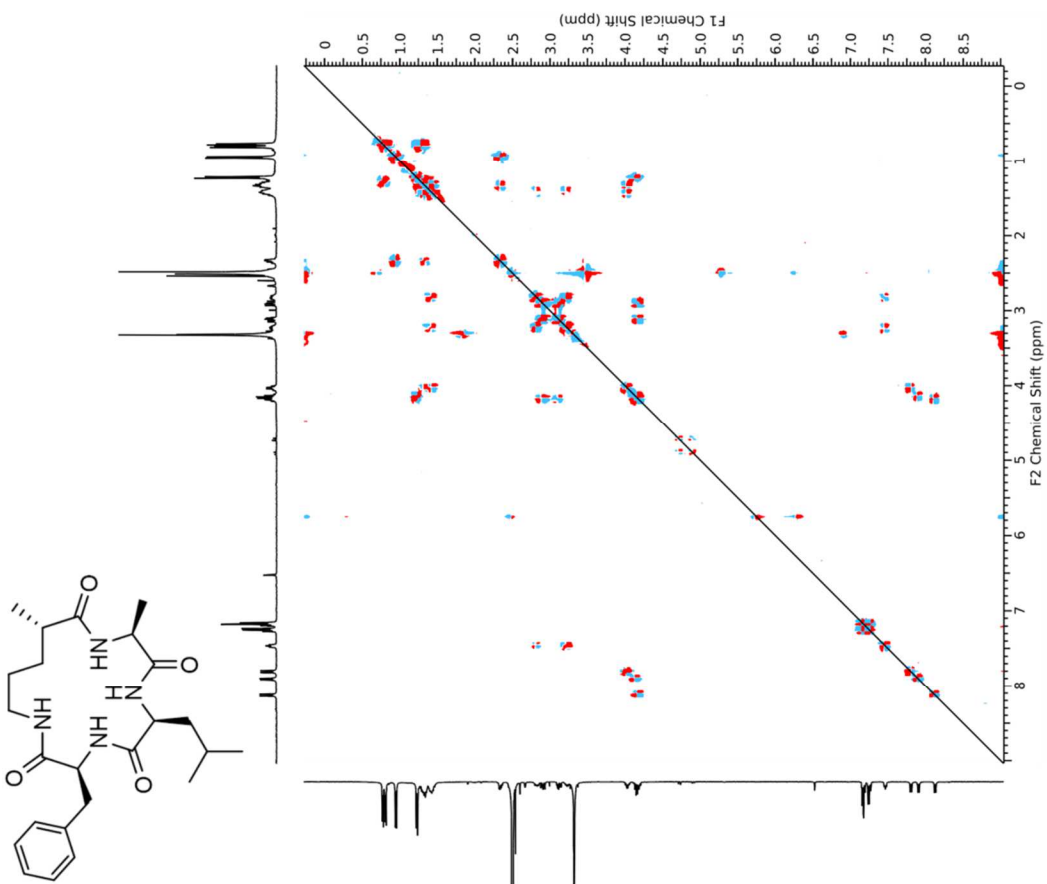
DMSO - TOCSY



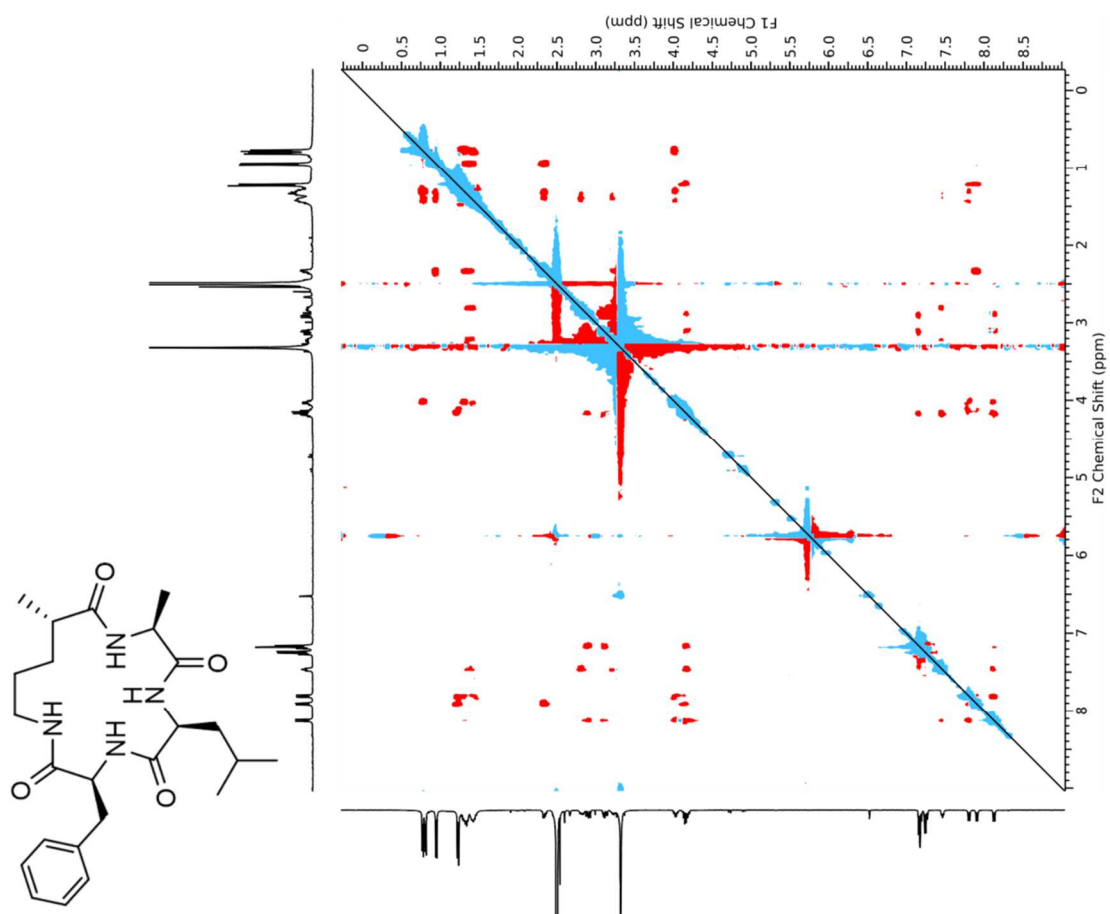
DMSO – COSY



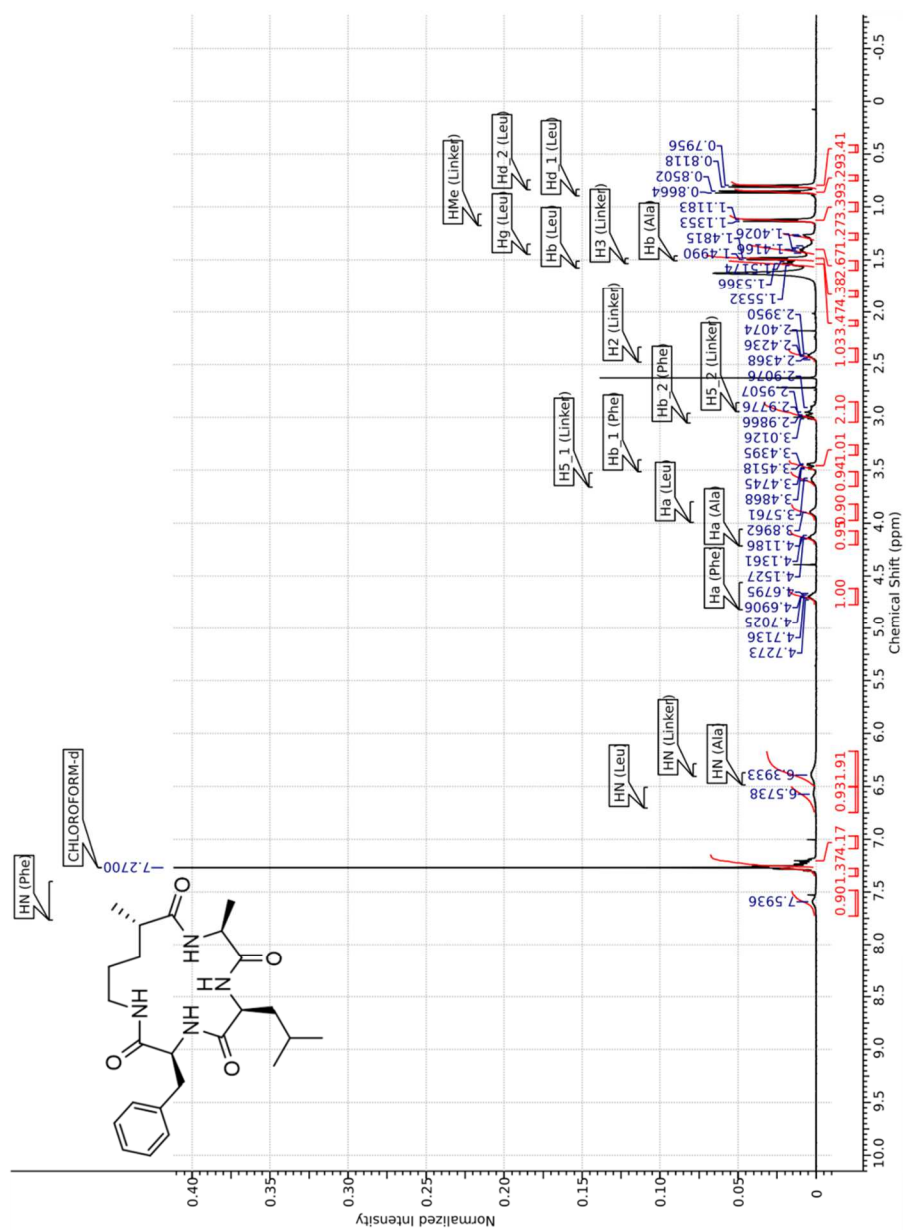
DMSO – HSQC



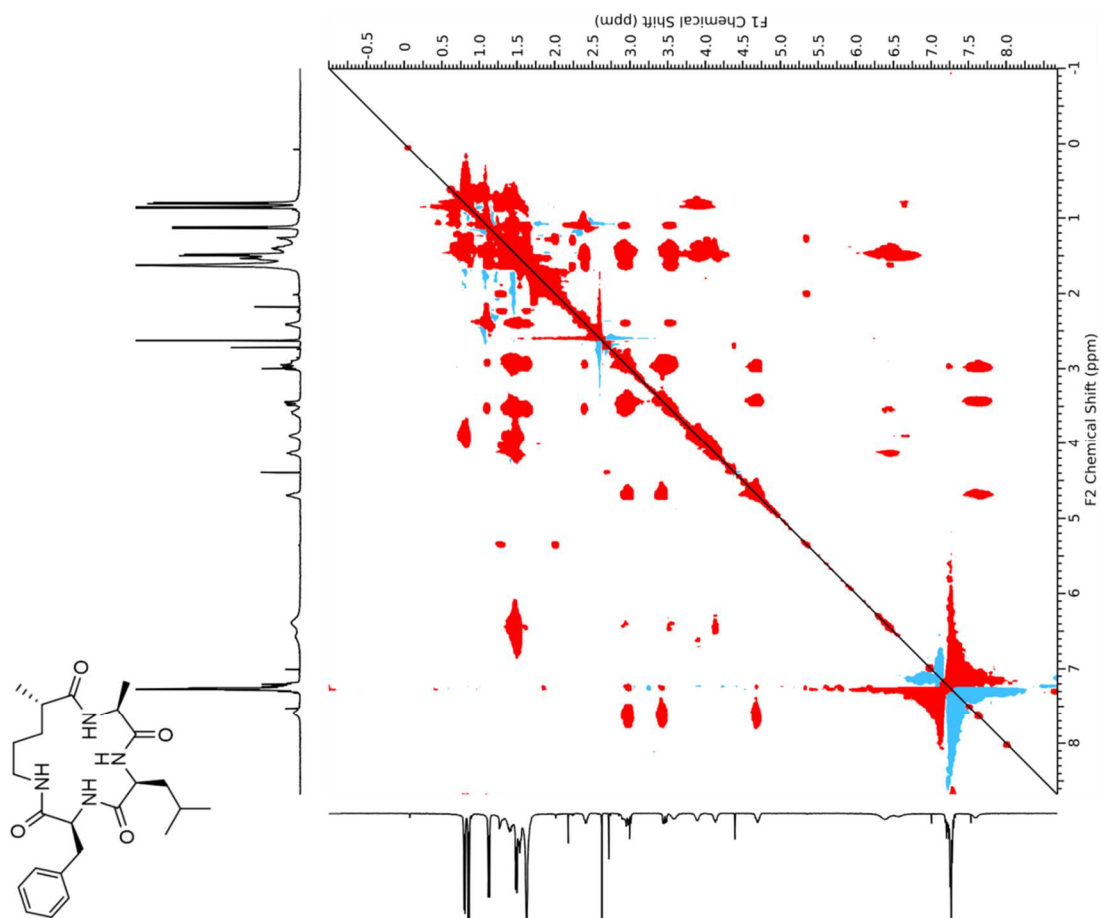
DMSO – ROESY



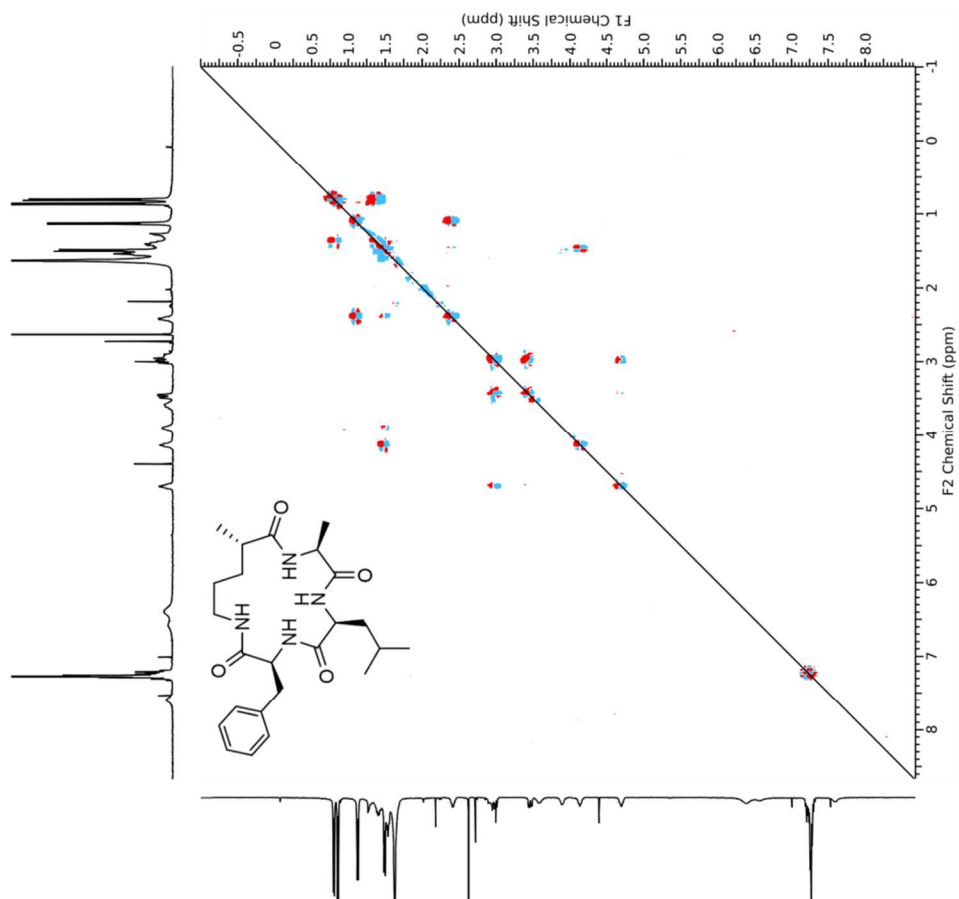
CDCl₃ – ¹H



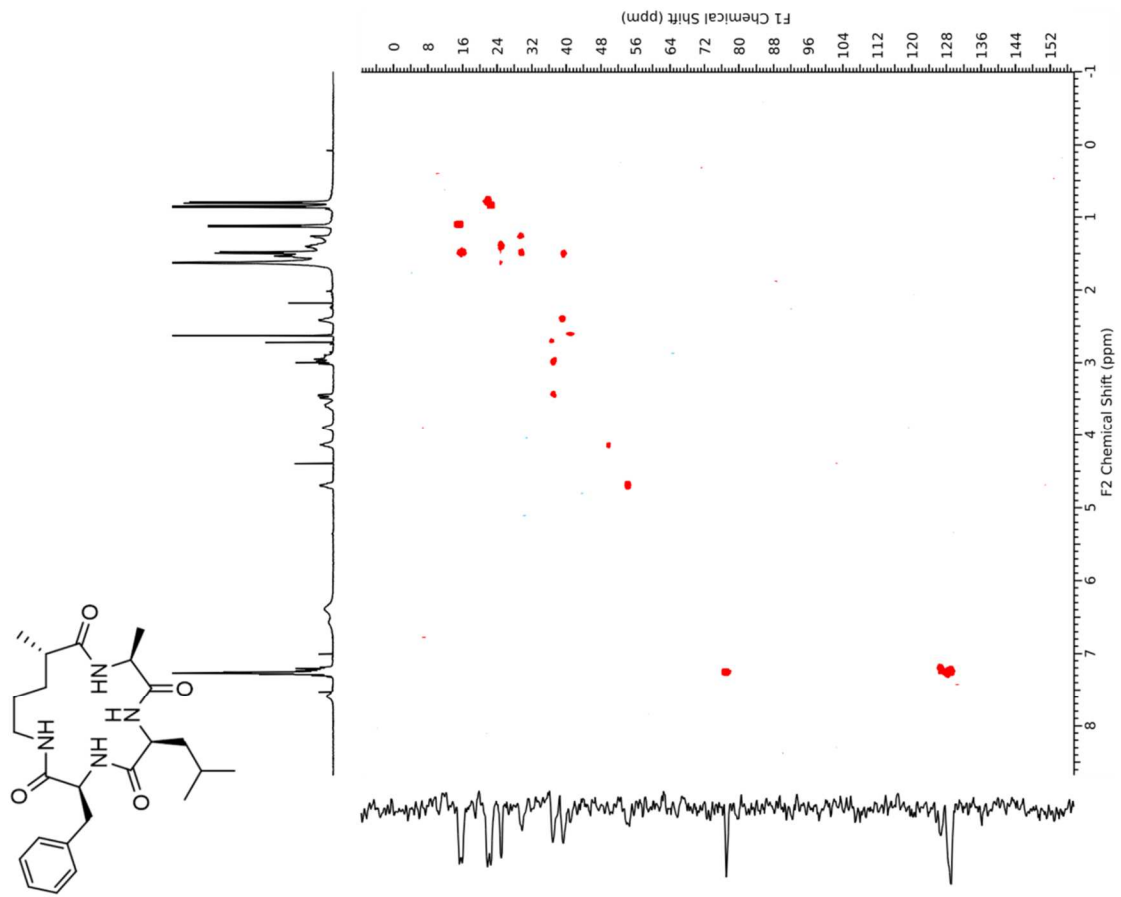
CDCl₃ – TOCSY



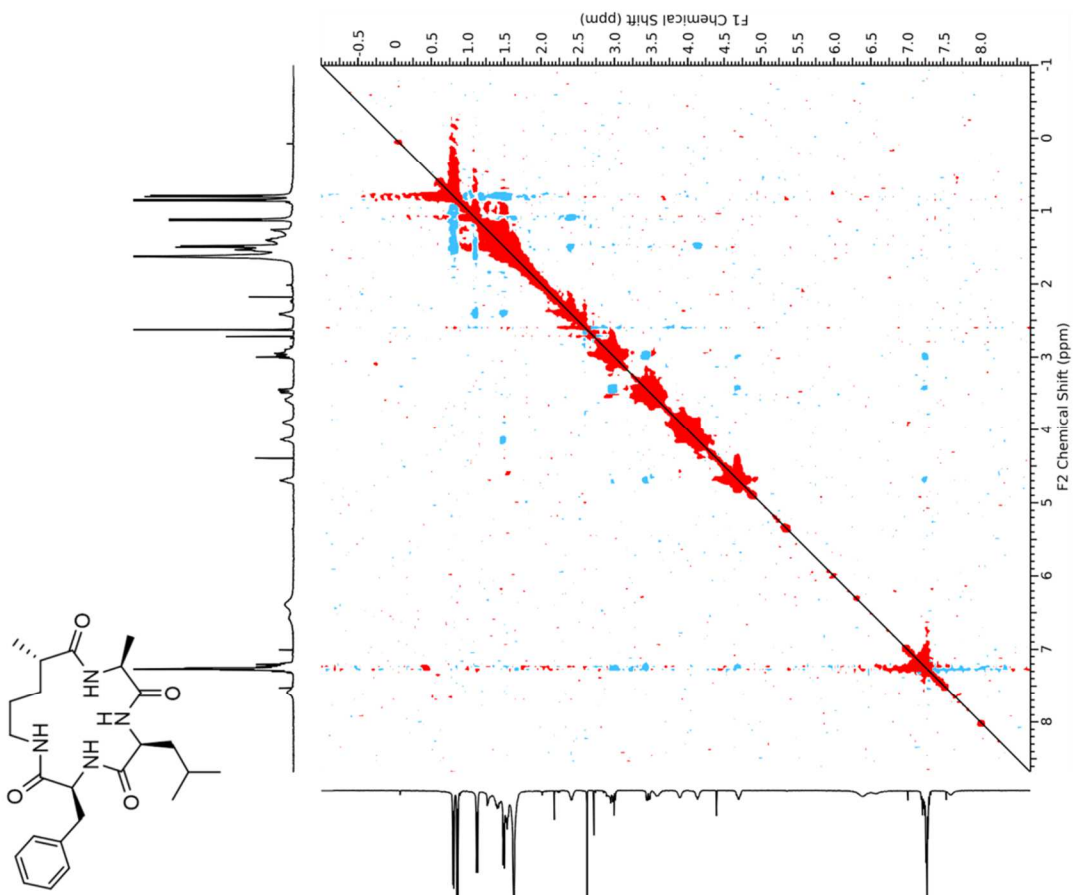
CDCl₃ – COSY



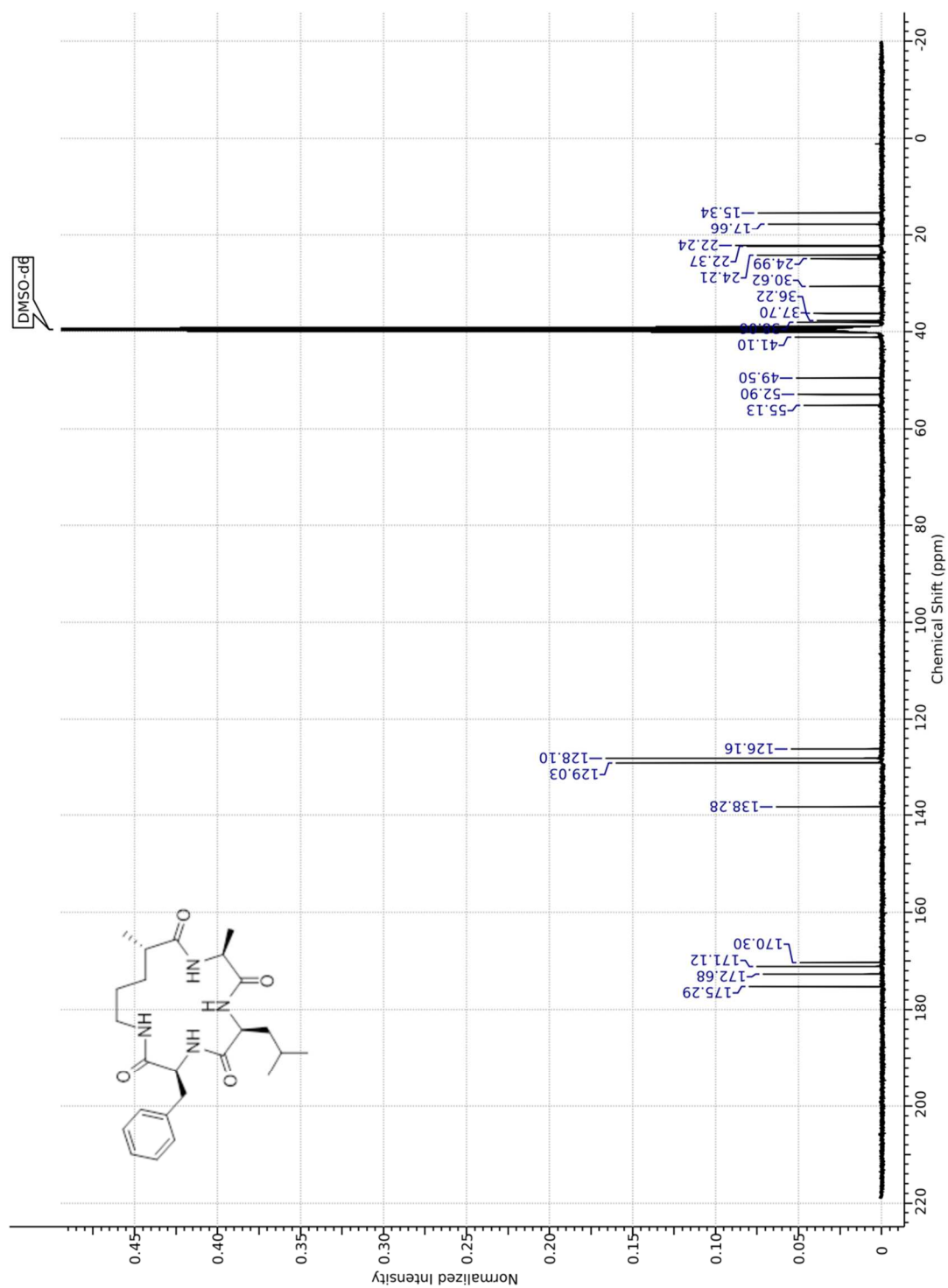
CDCl₃ – HSQC



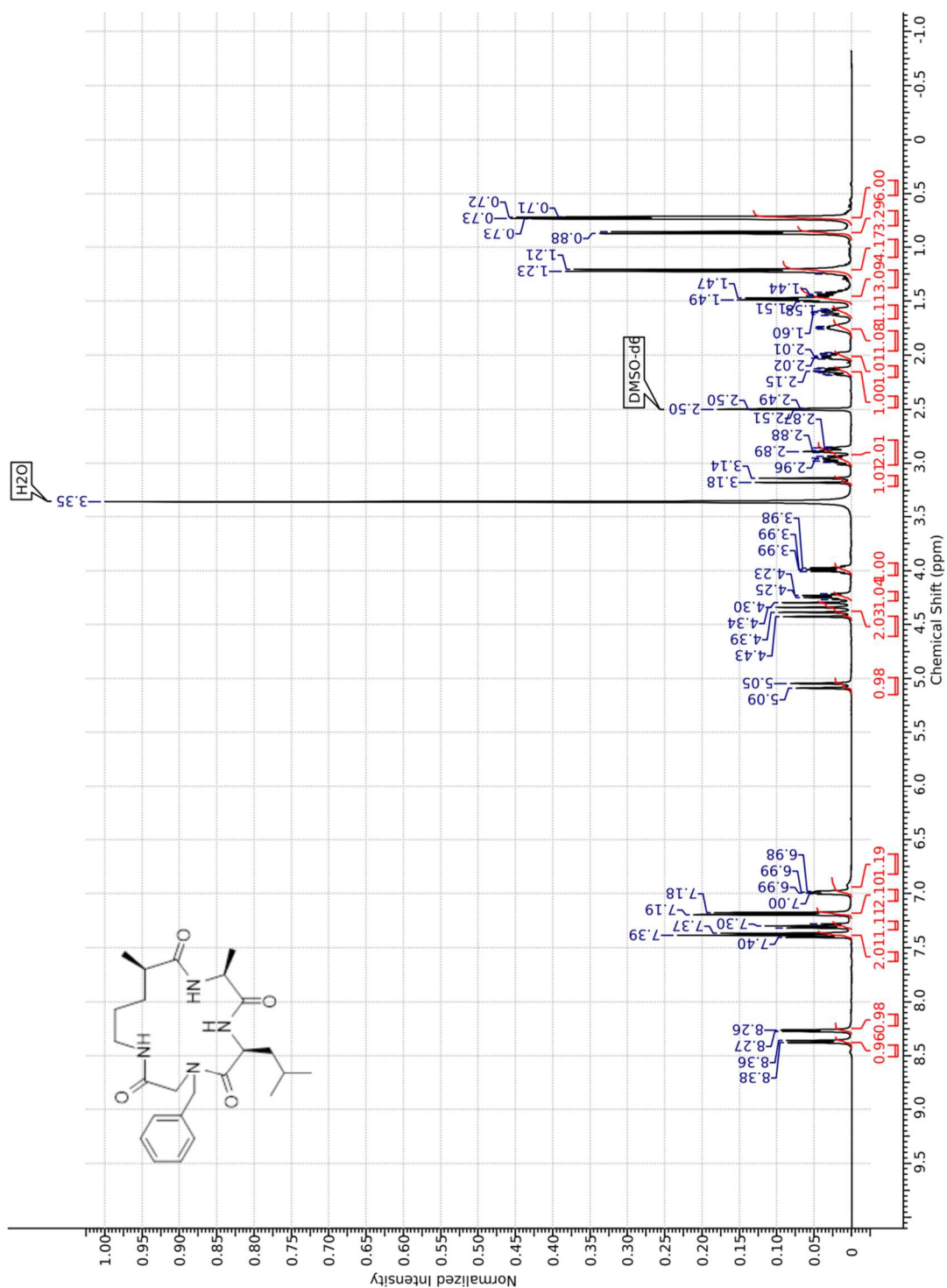
CDCl₃ – ROESY

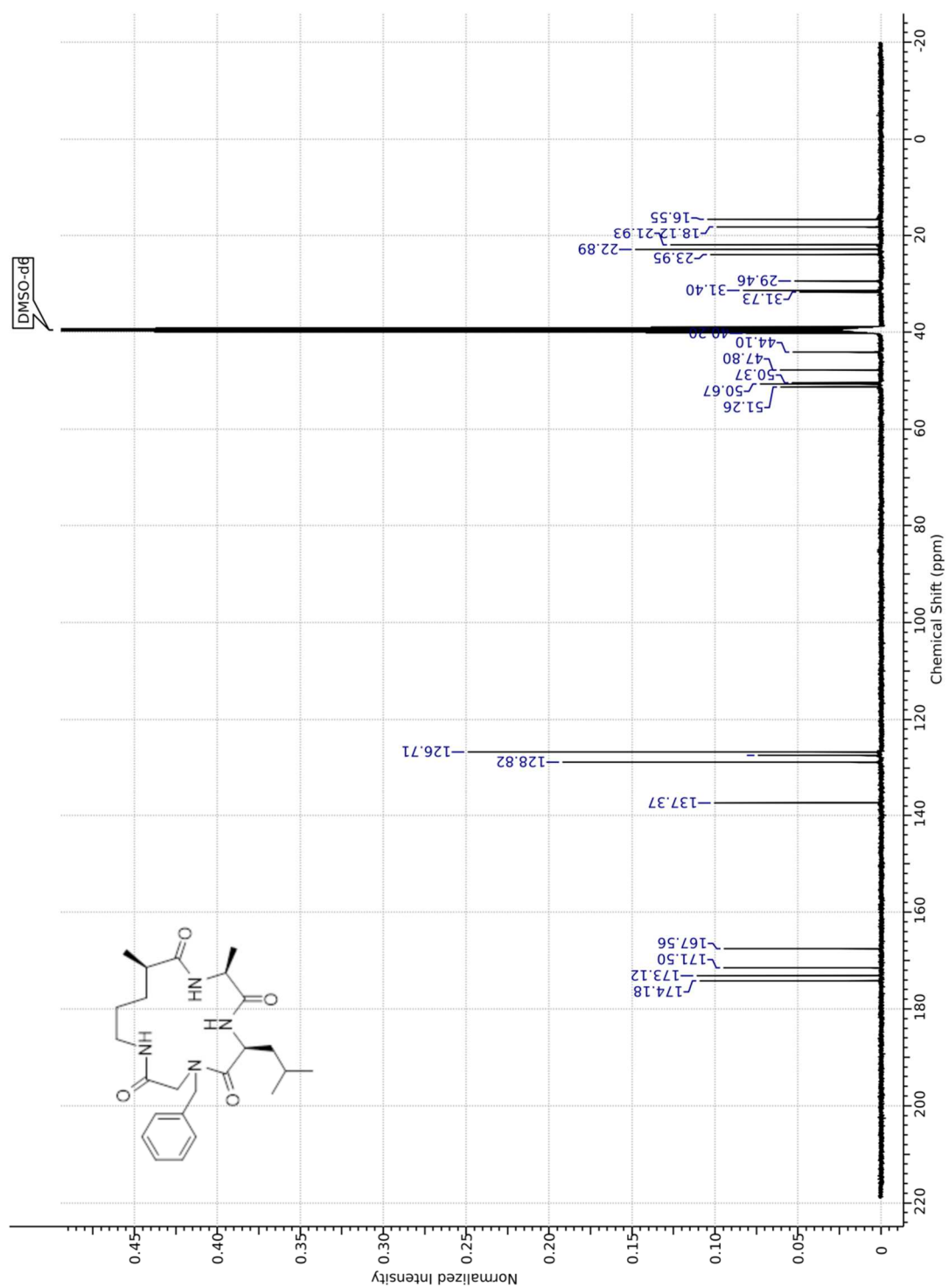


DMSO - ^{13}C



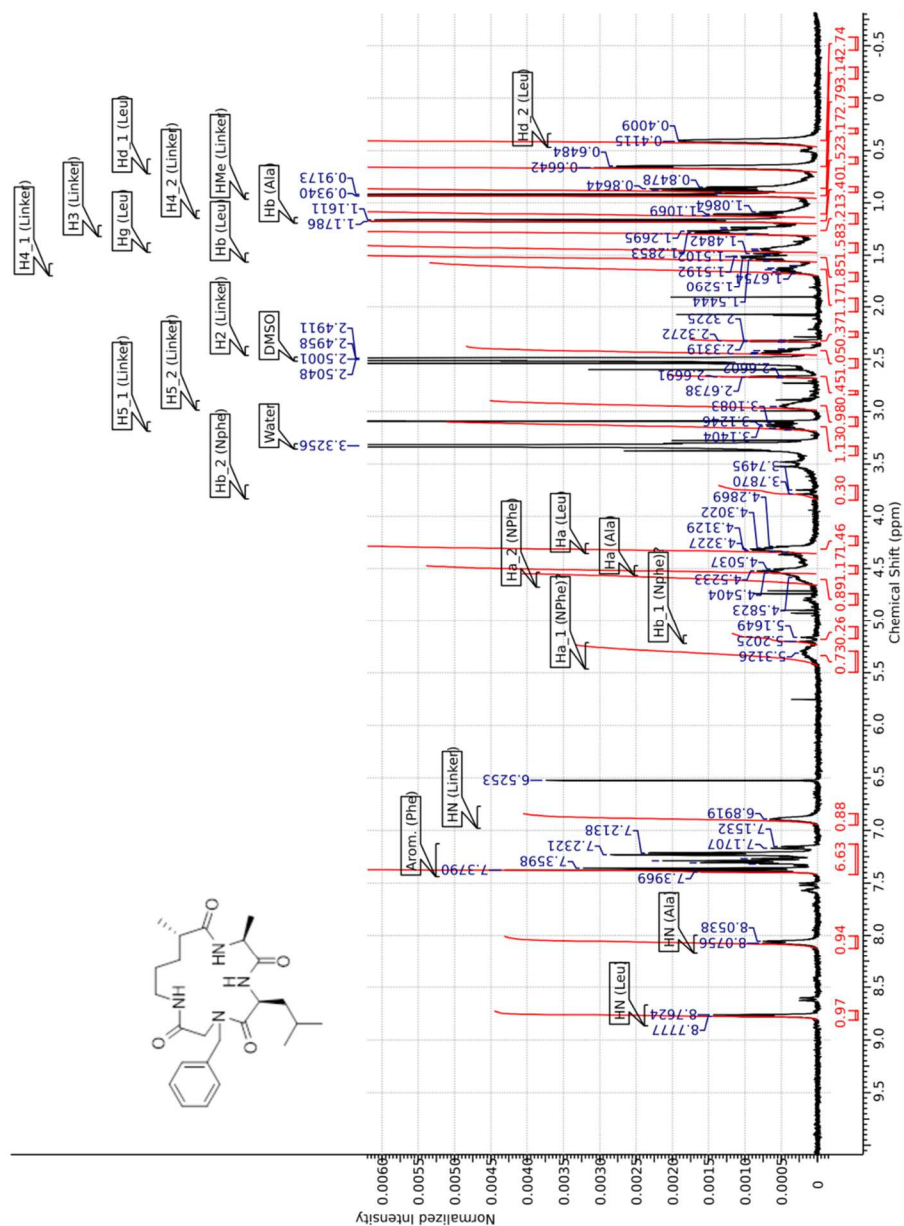
(6*S*,9*S*,12*R*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,12-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Nphe-2R) (38)



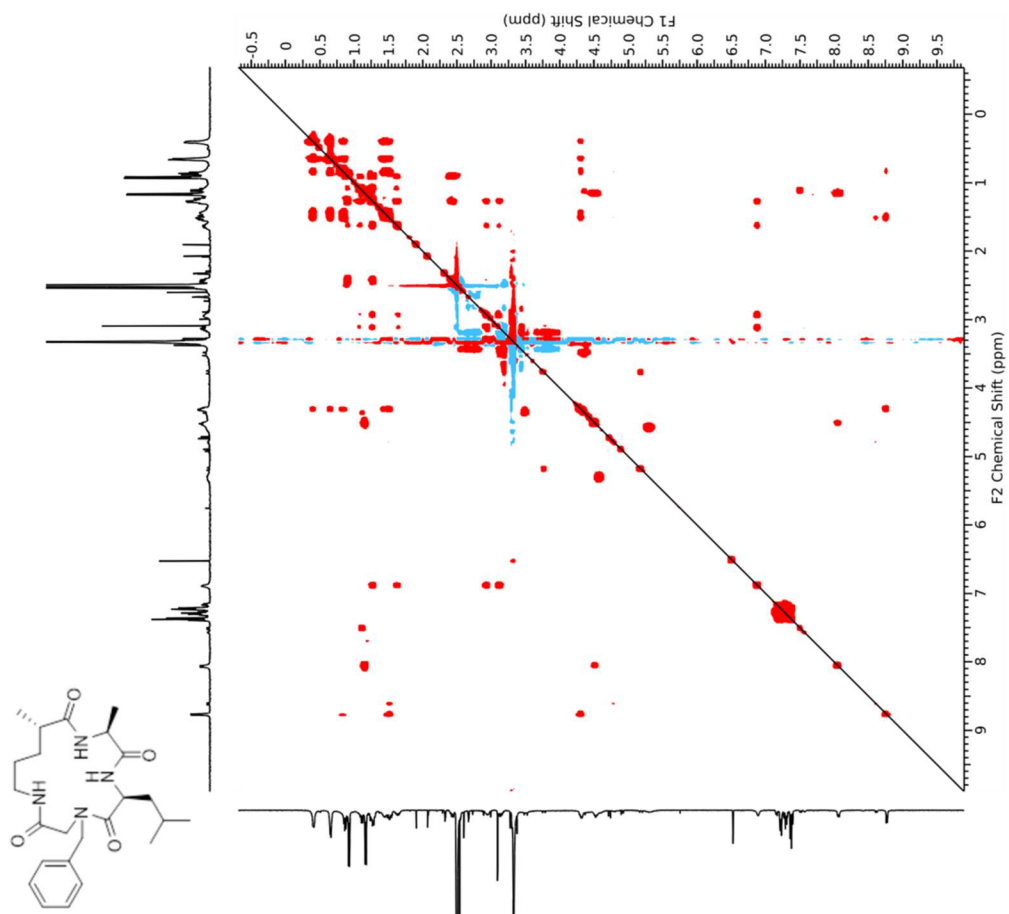


(6*S*,9*S*,12*S*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,12-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Nphe-2*S*) (39)

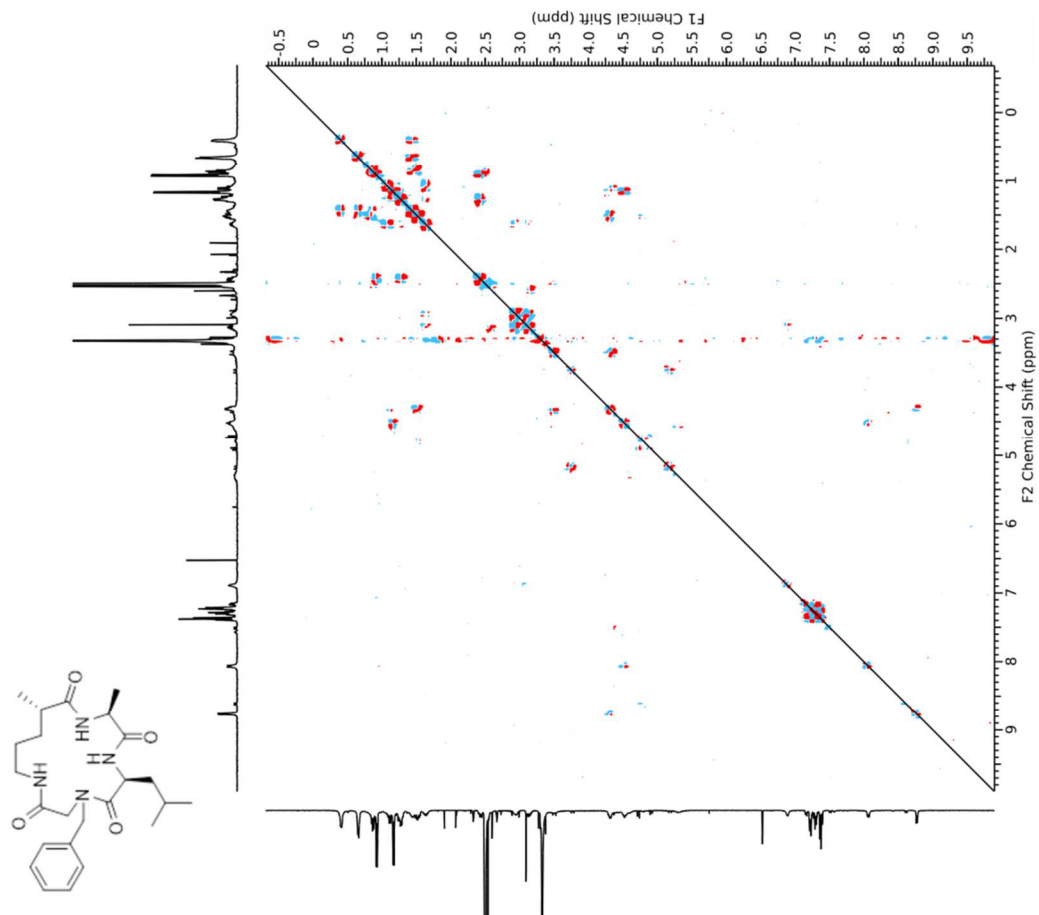
DMSO – ¹H



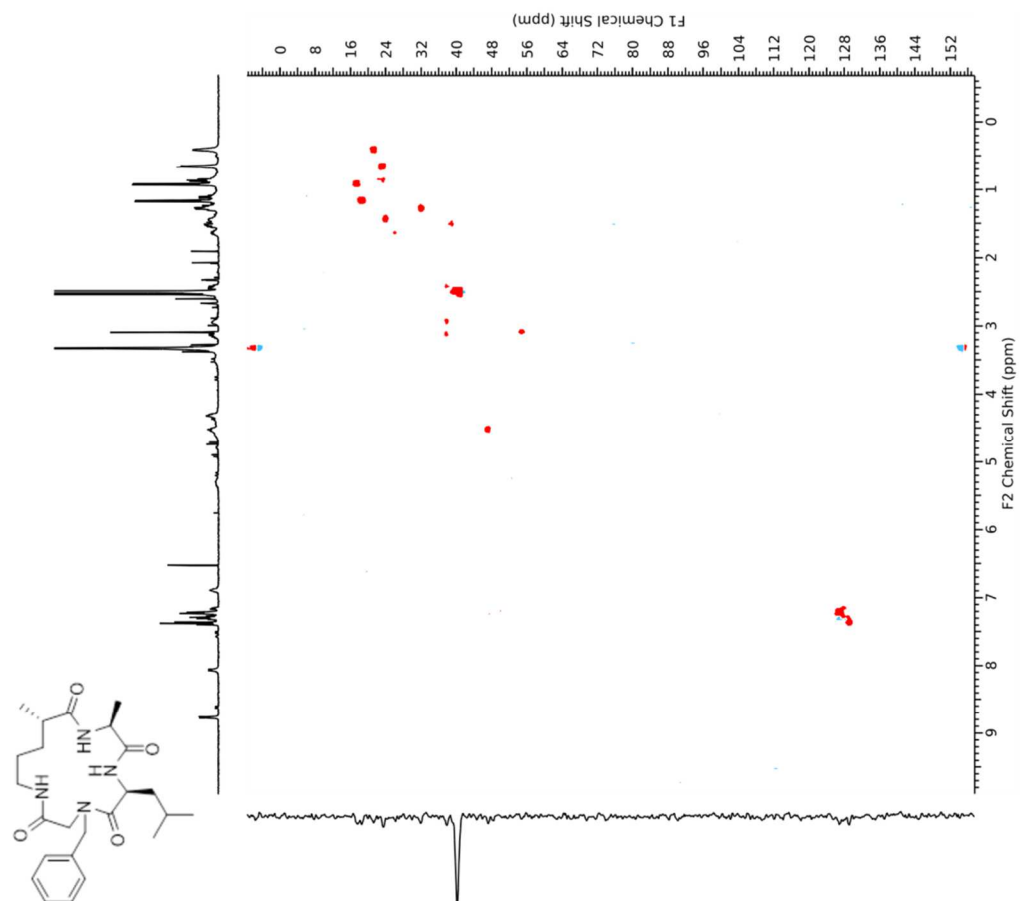
DMSO - TOCSY



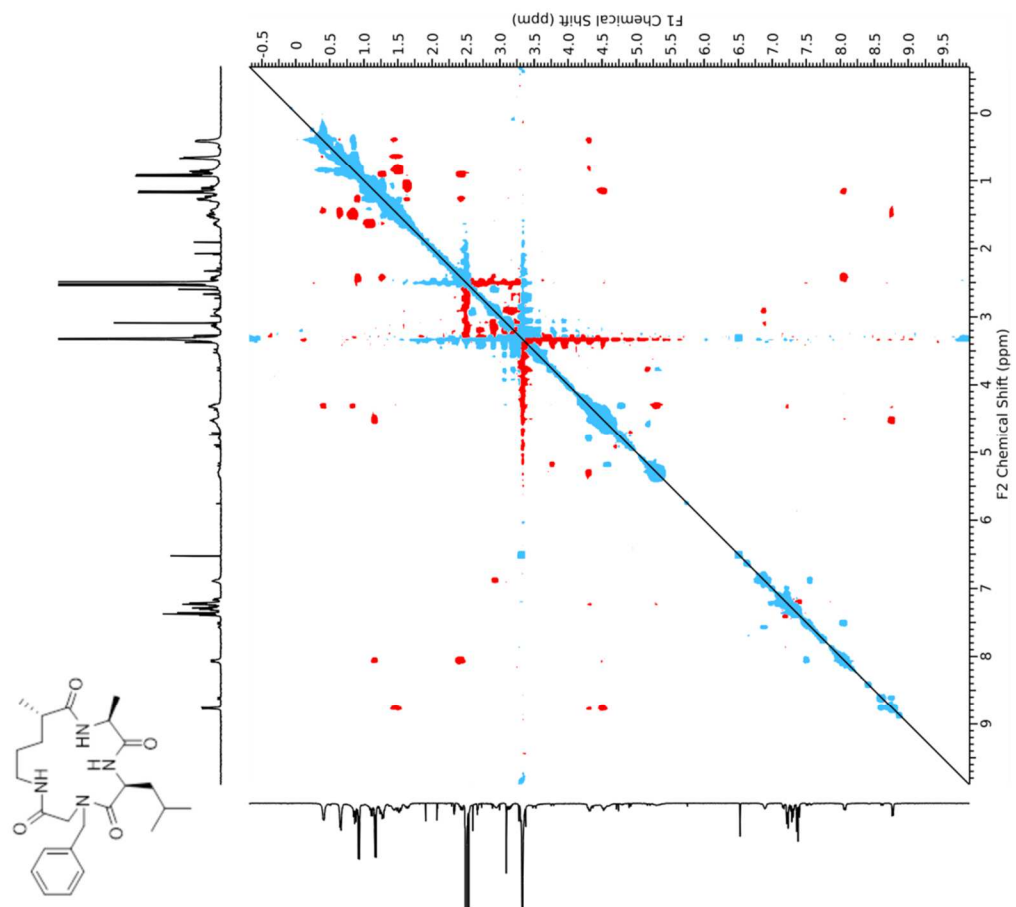
DMSO – COSY



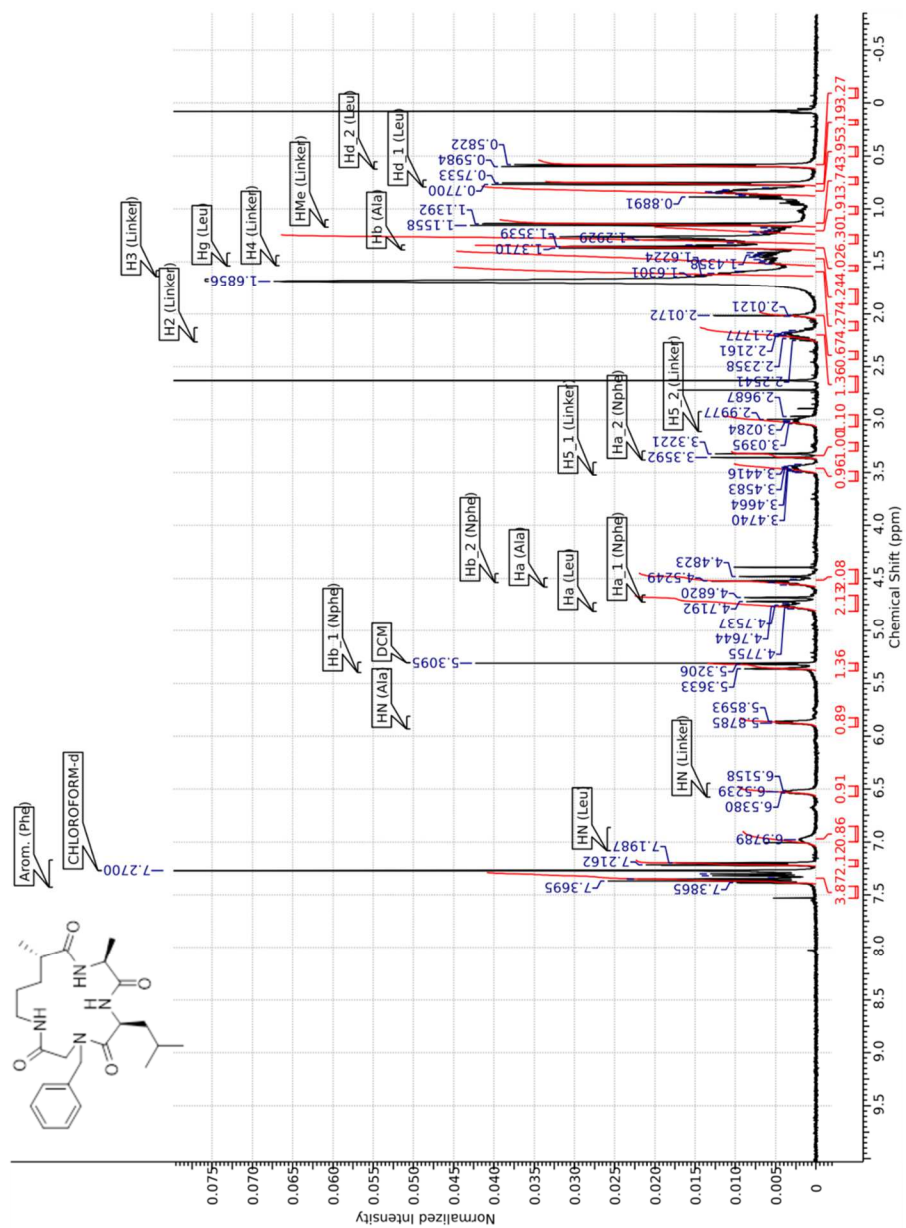
DMSO - HSQC



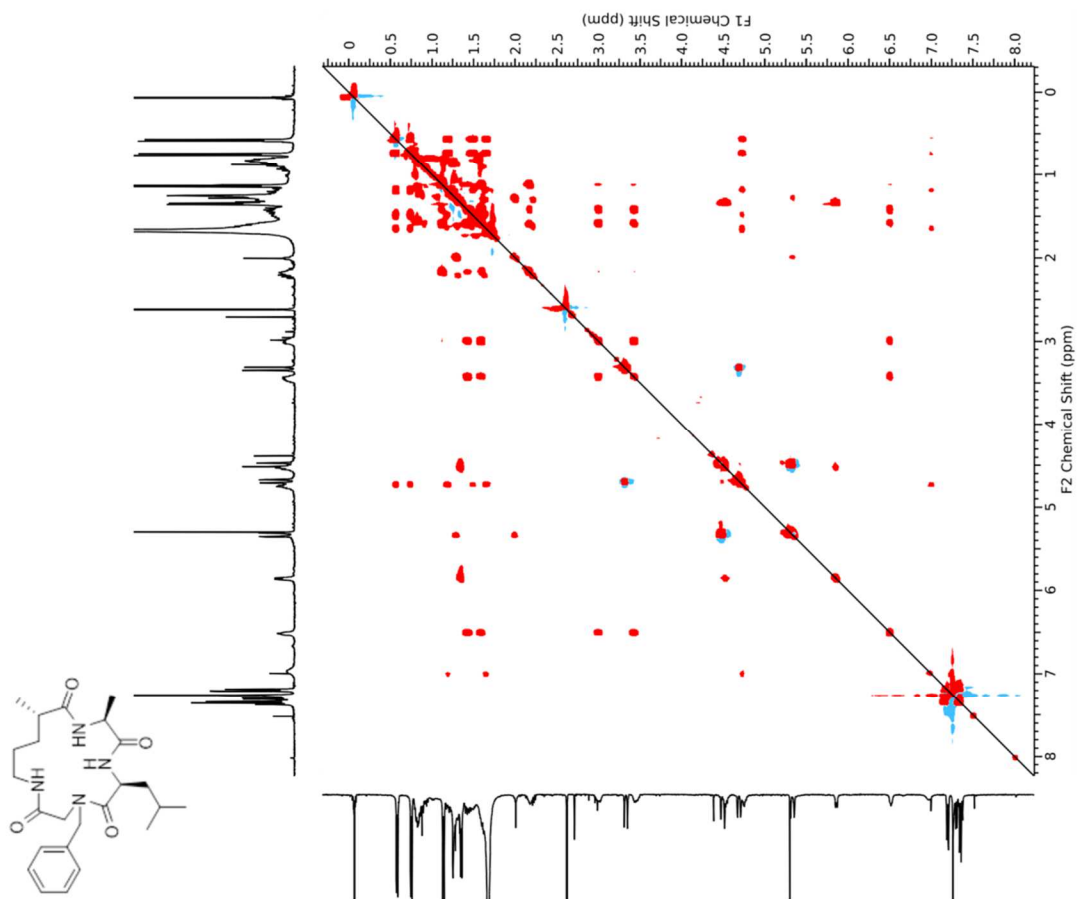
DMSO – ROESY



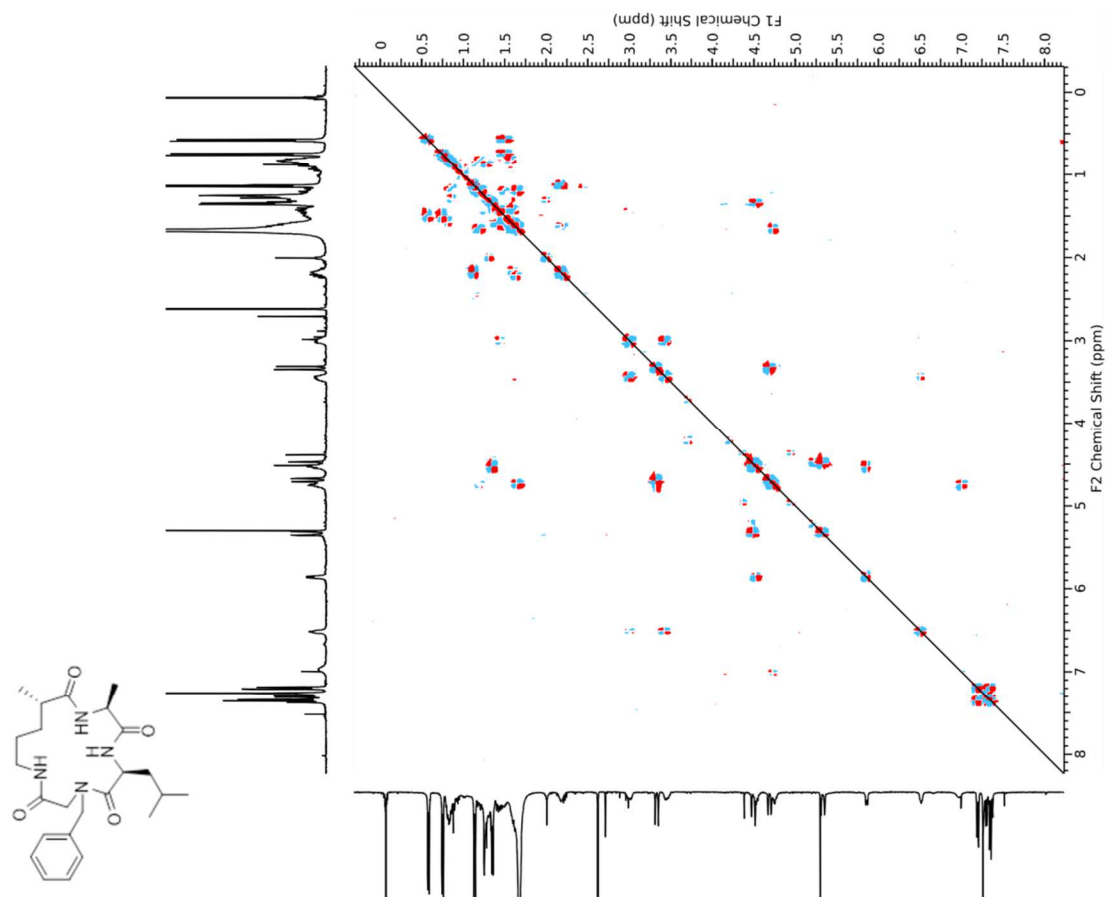
CDCl₃ – ¹H



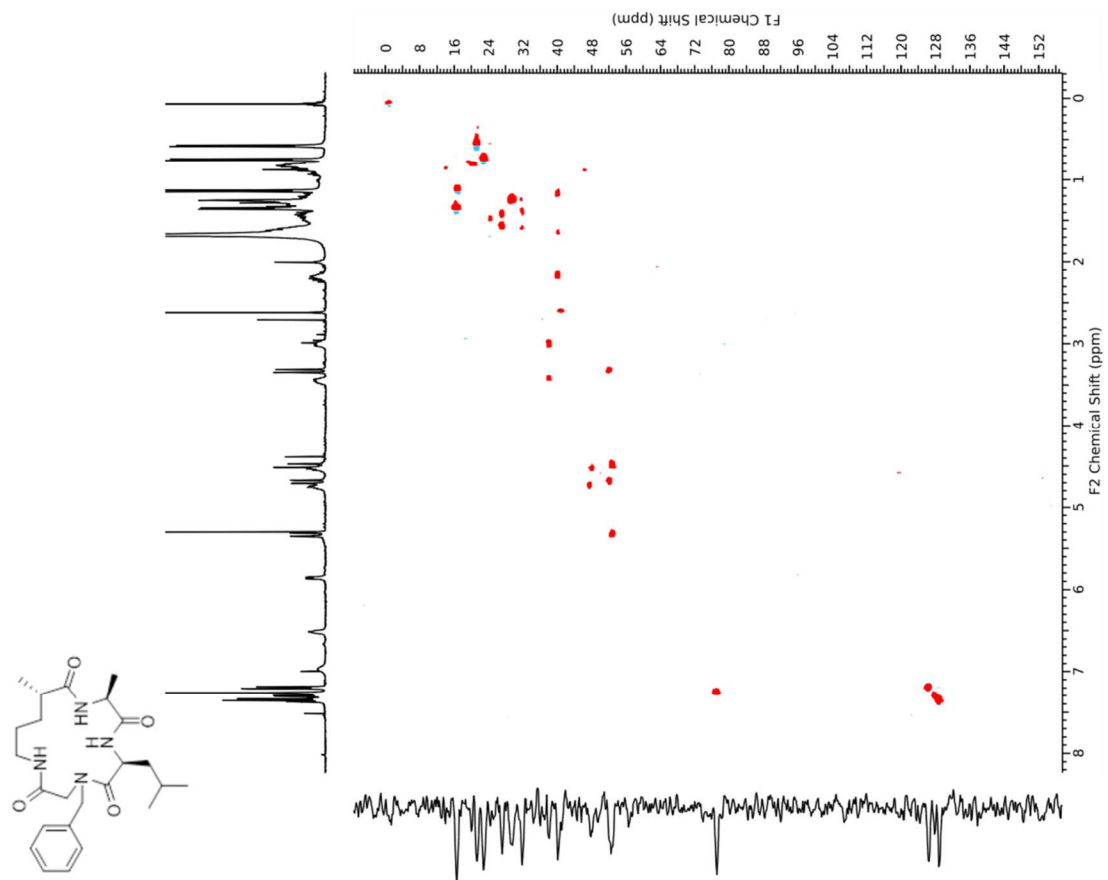
CDCl₃ – TOCSY



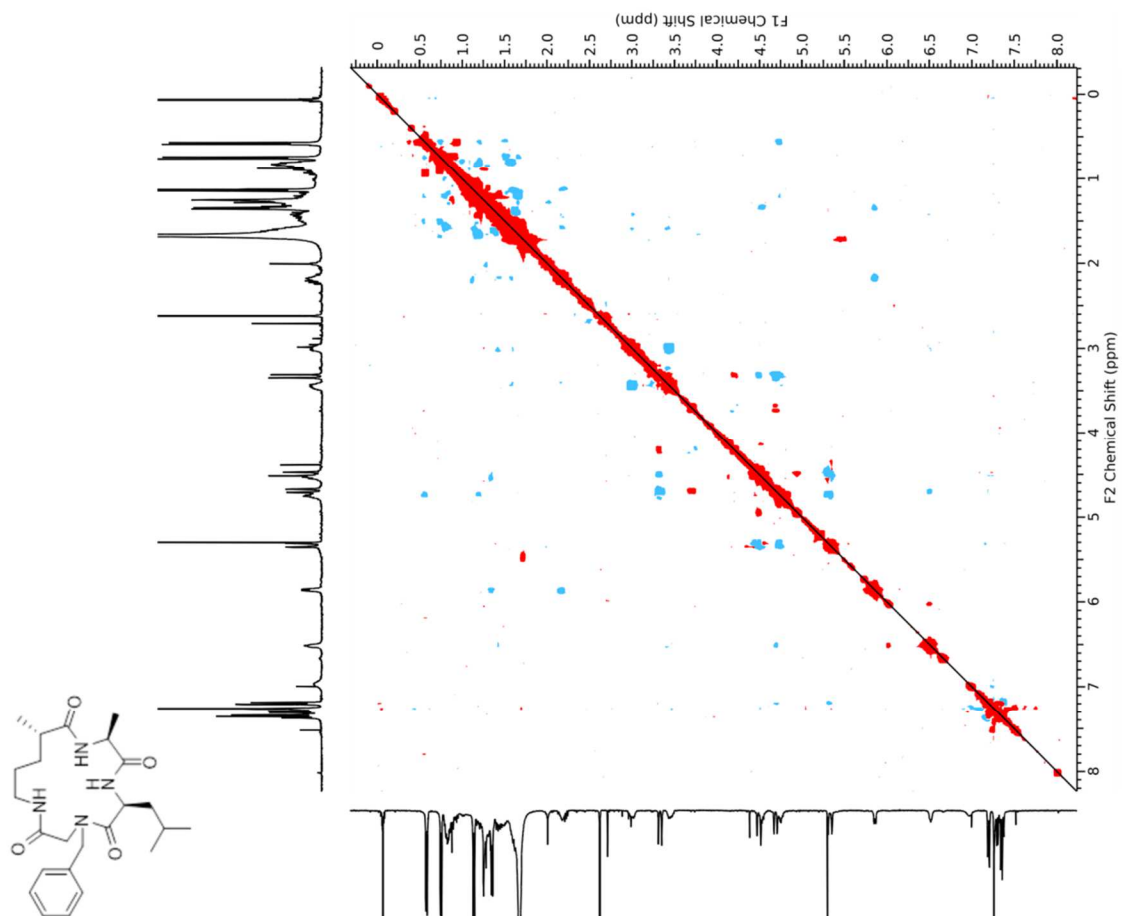
CDCl₃ – COSY



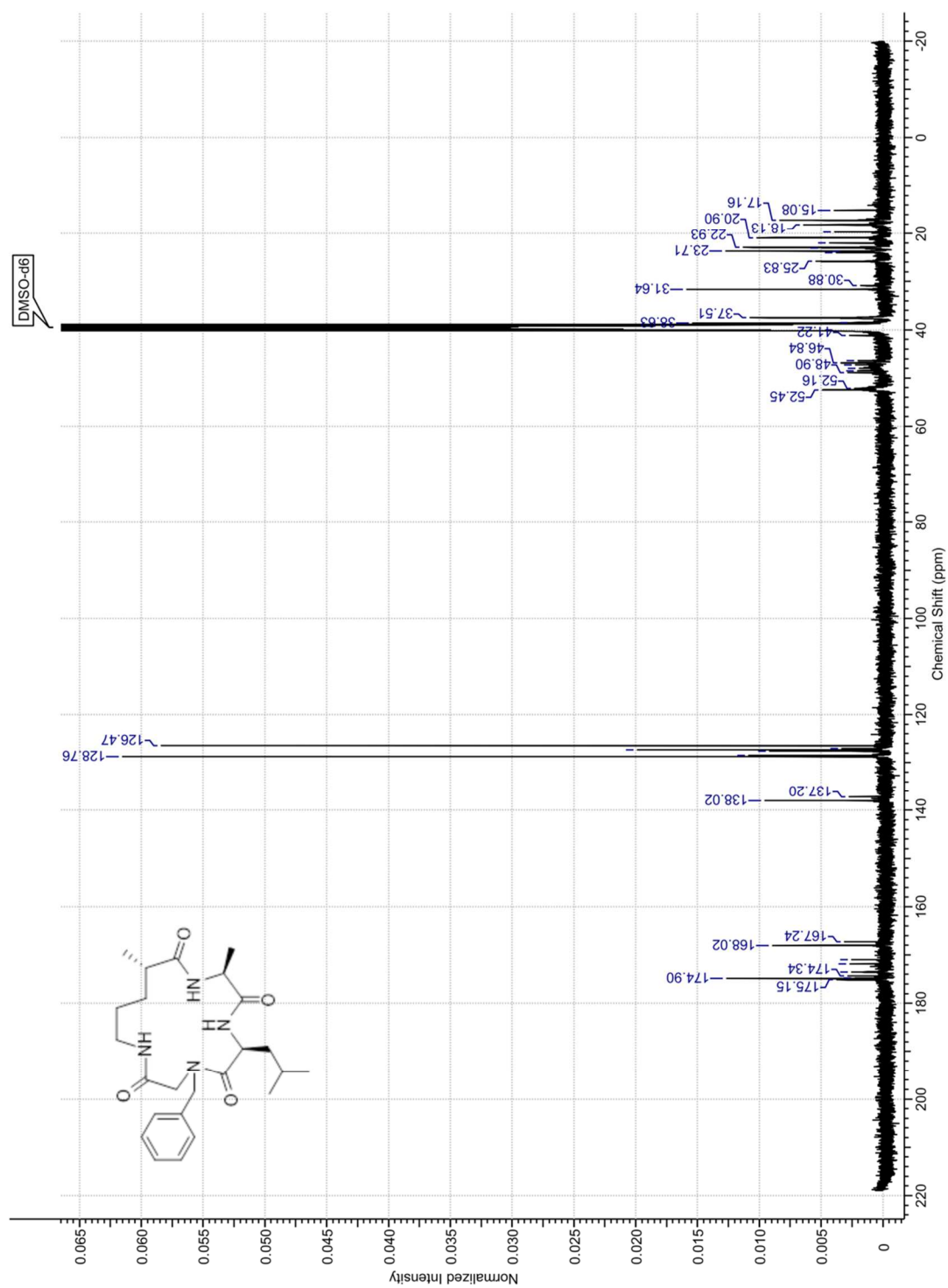
CDCl₃ – HSQC



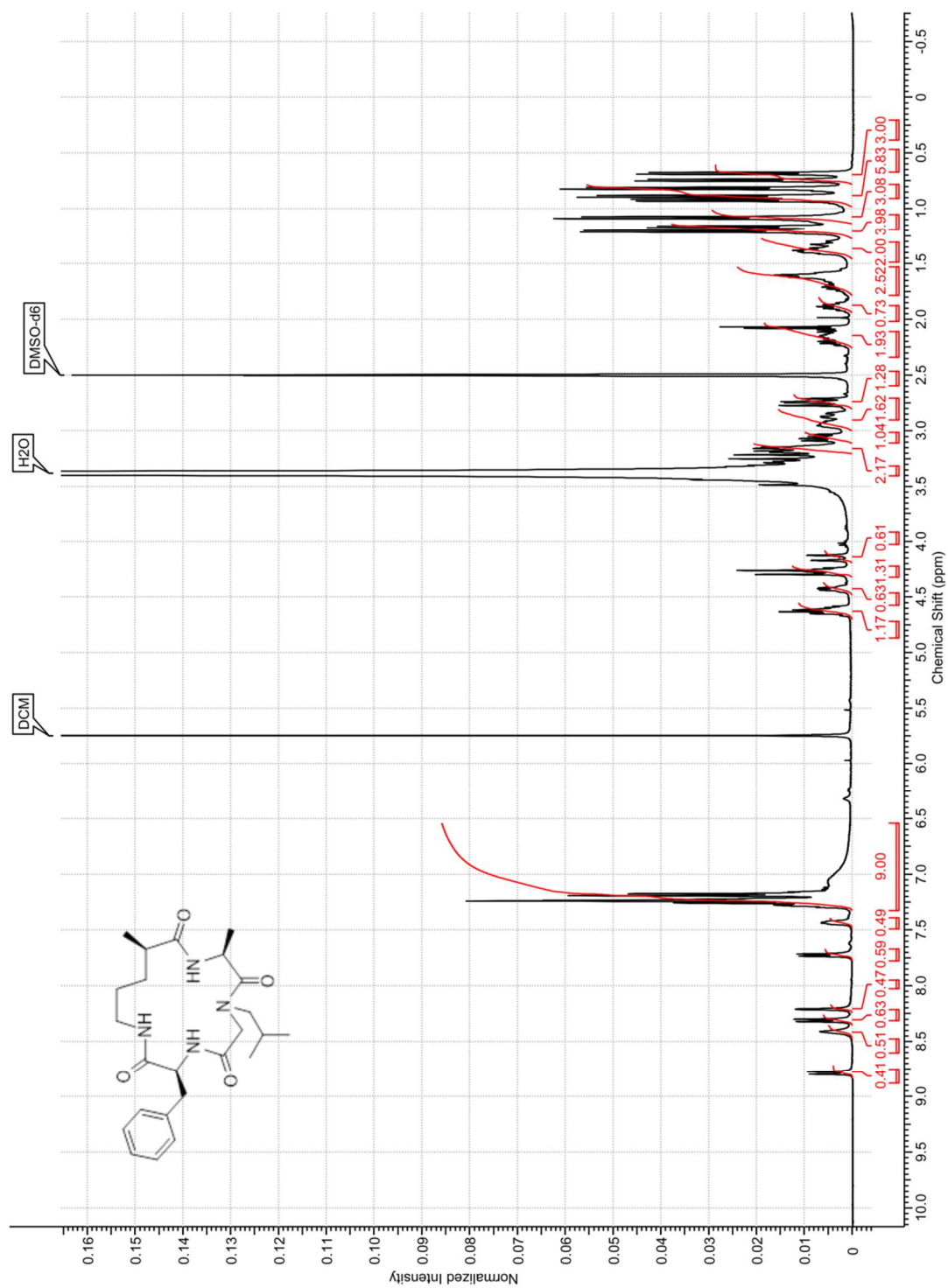
CDCl₃ – ROESY



DMSO - ^{13}C

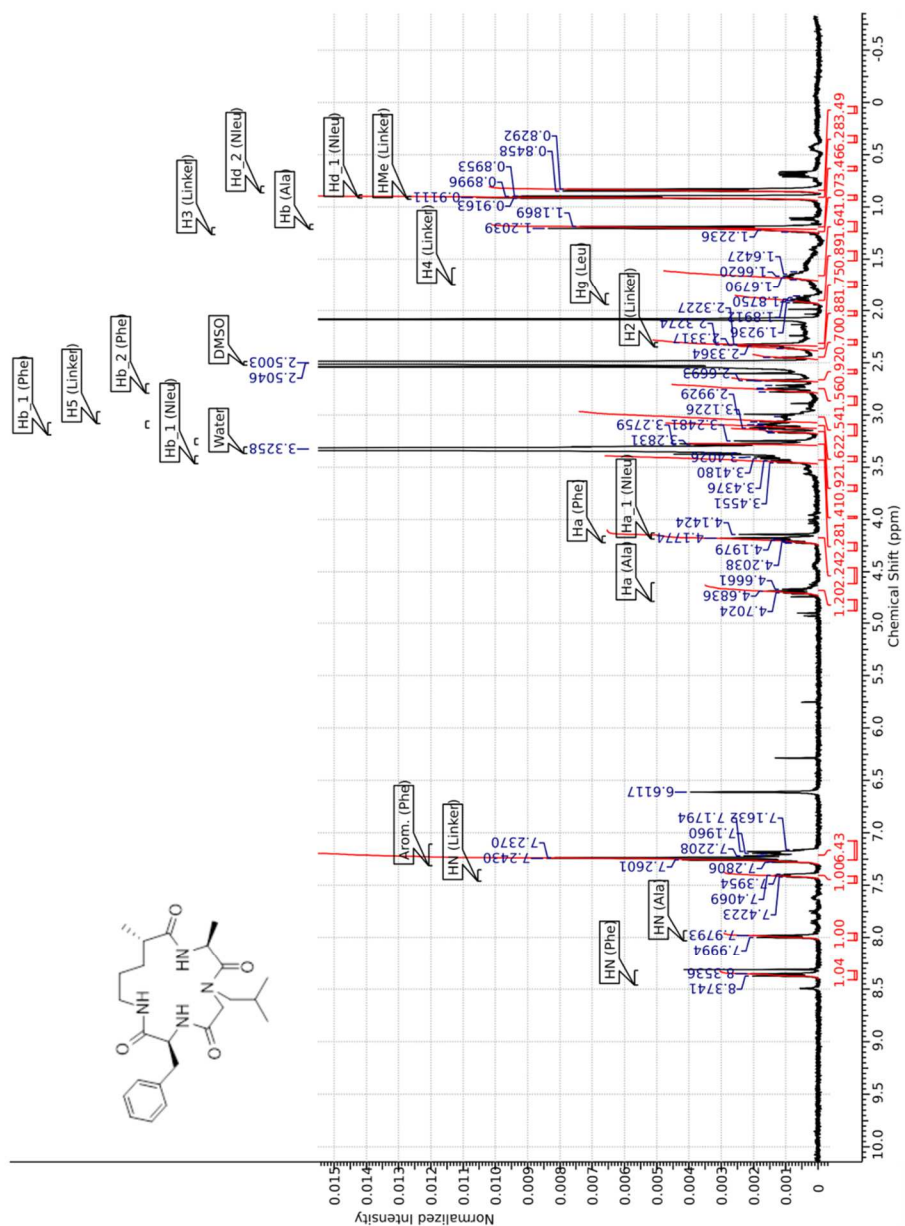


(3*S*,9*S*,12*R*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,12-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nleu-2R) (40)

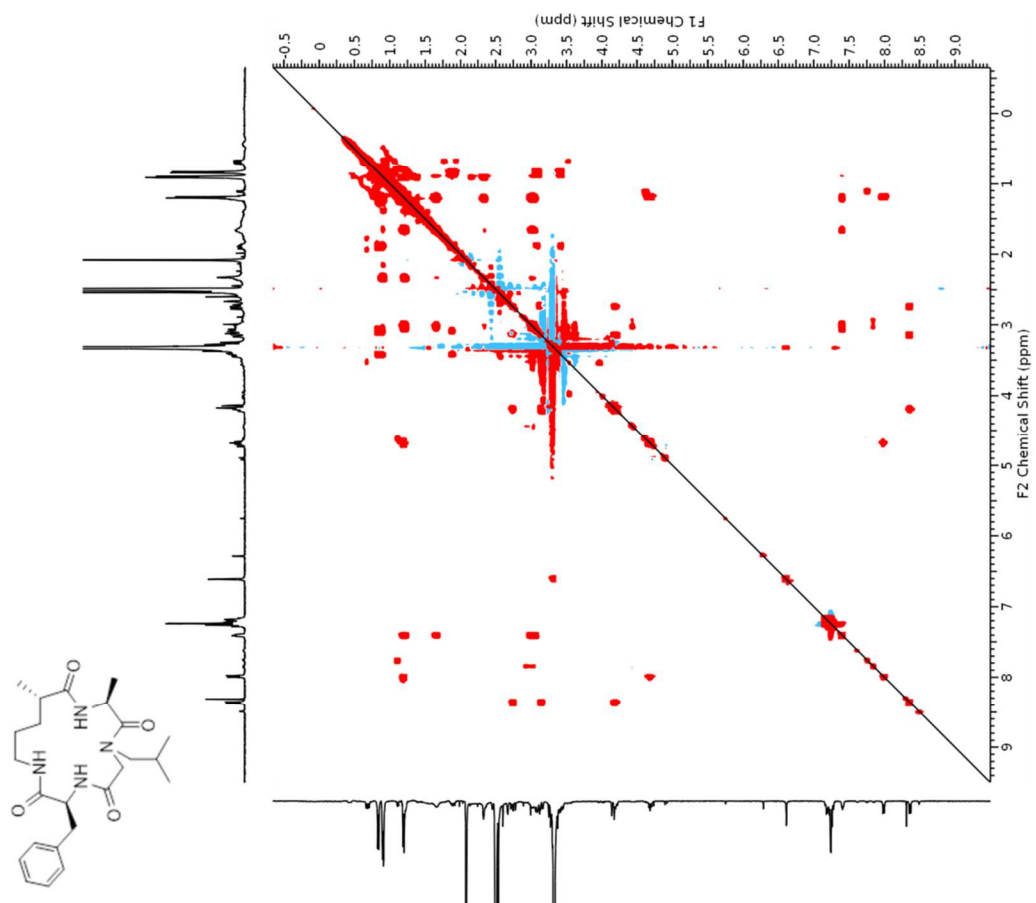


(3S,9S,12S)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,12-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Nleu-2S) (41)

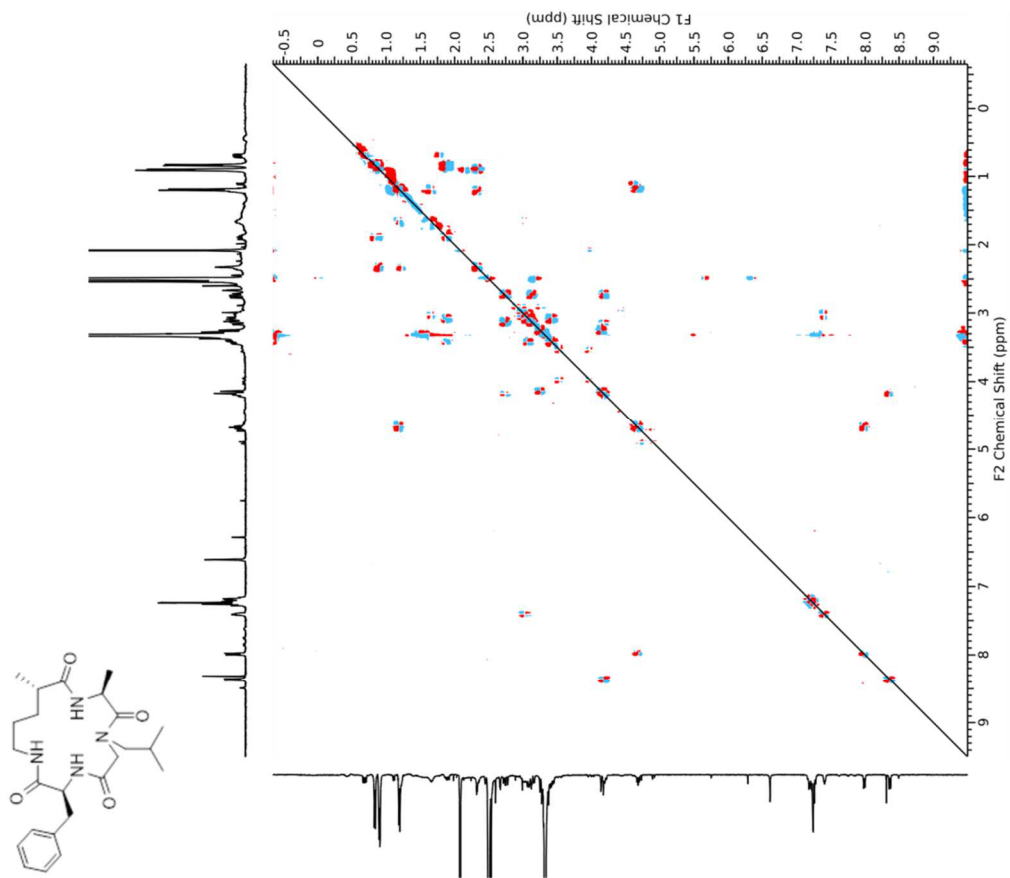
DMSO - ¹H



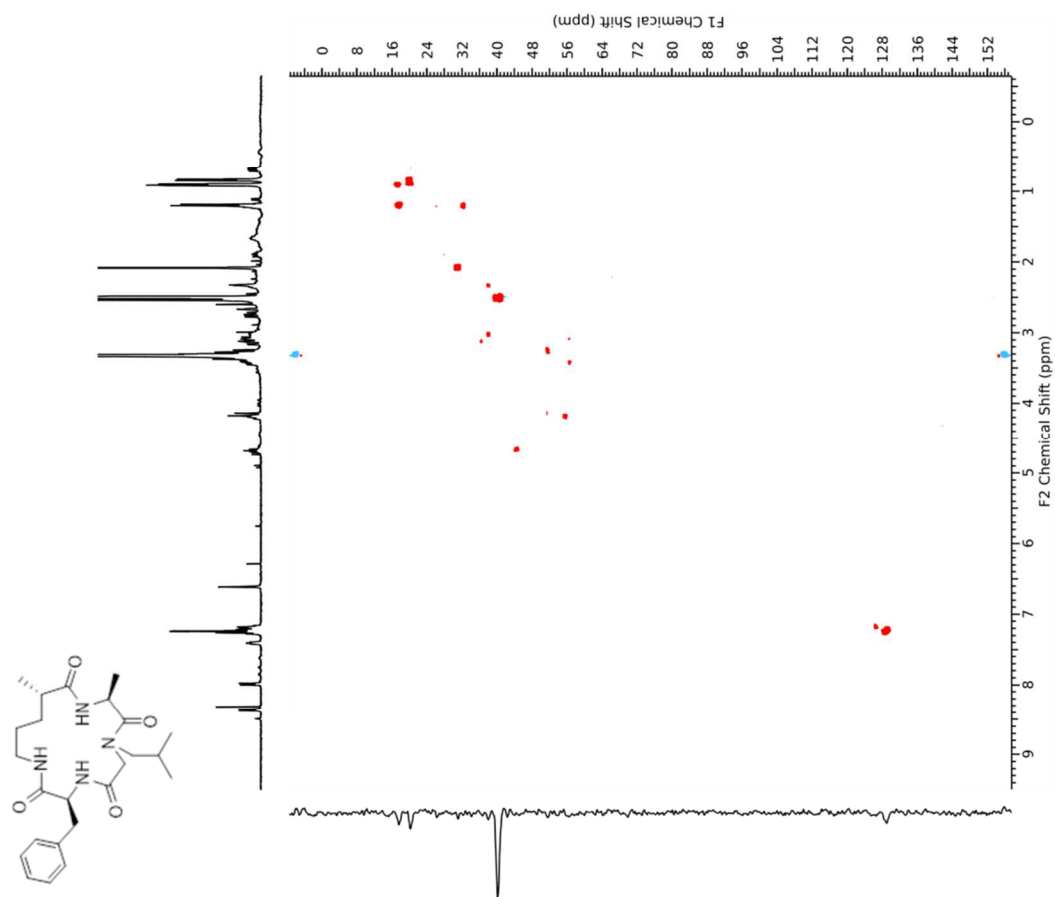
DMSO - TOCSY



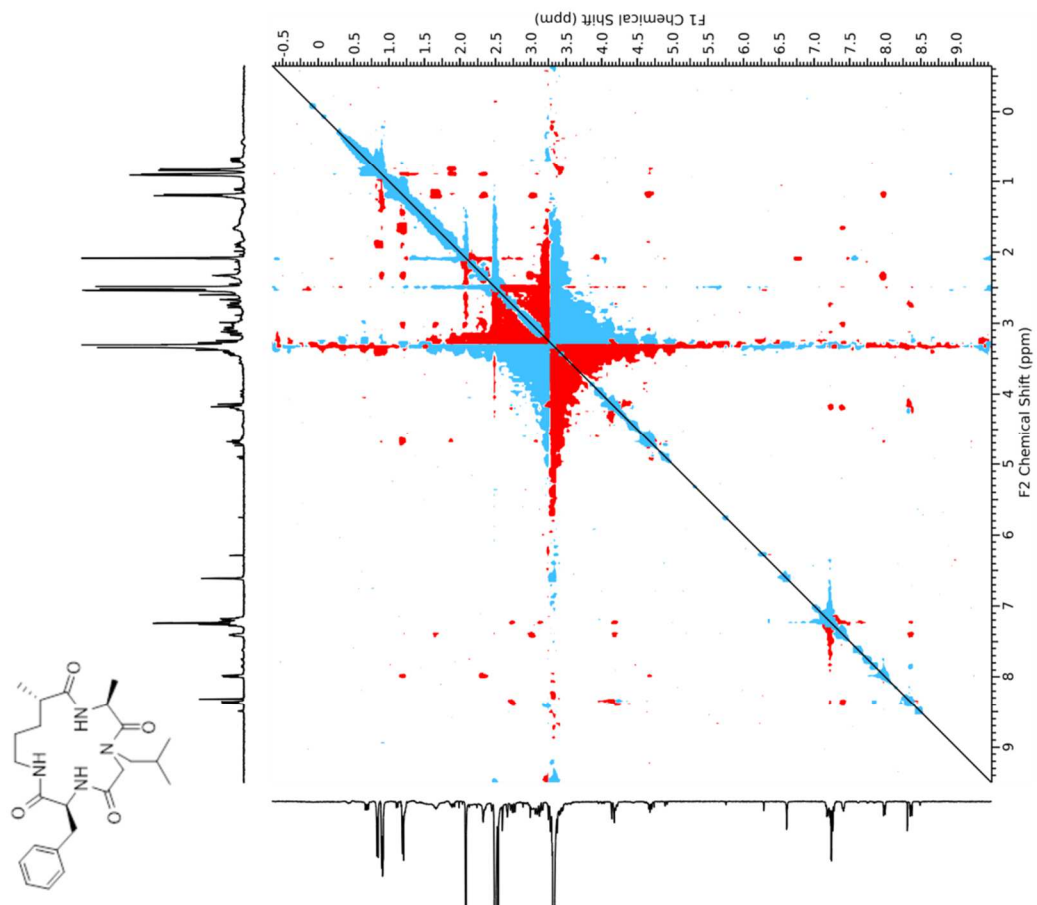
DMSO – COSY



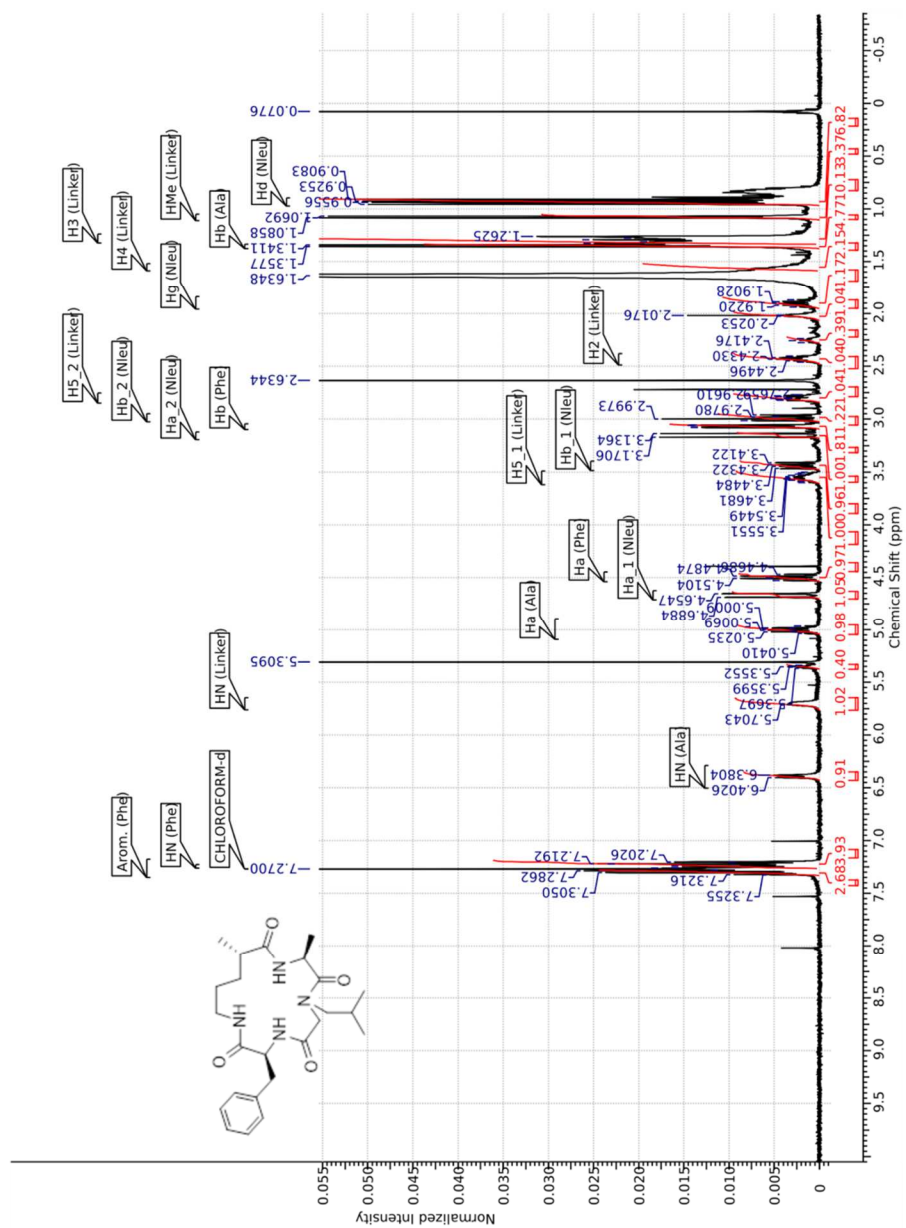
DMSO - HSQC



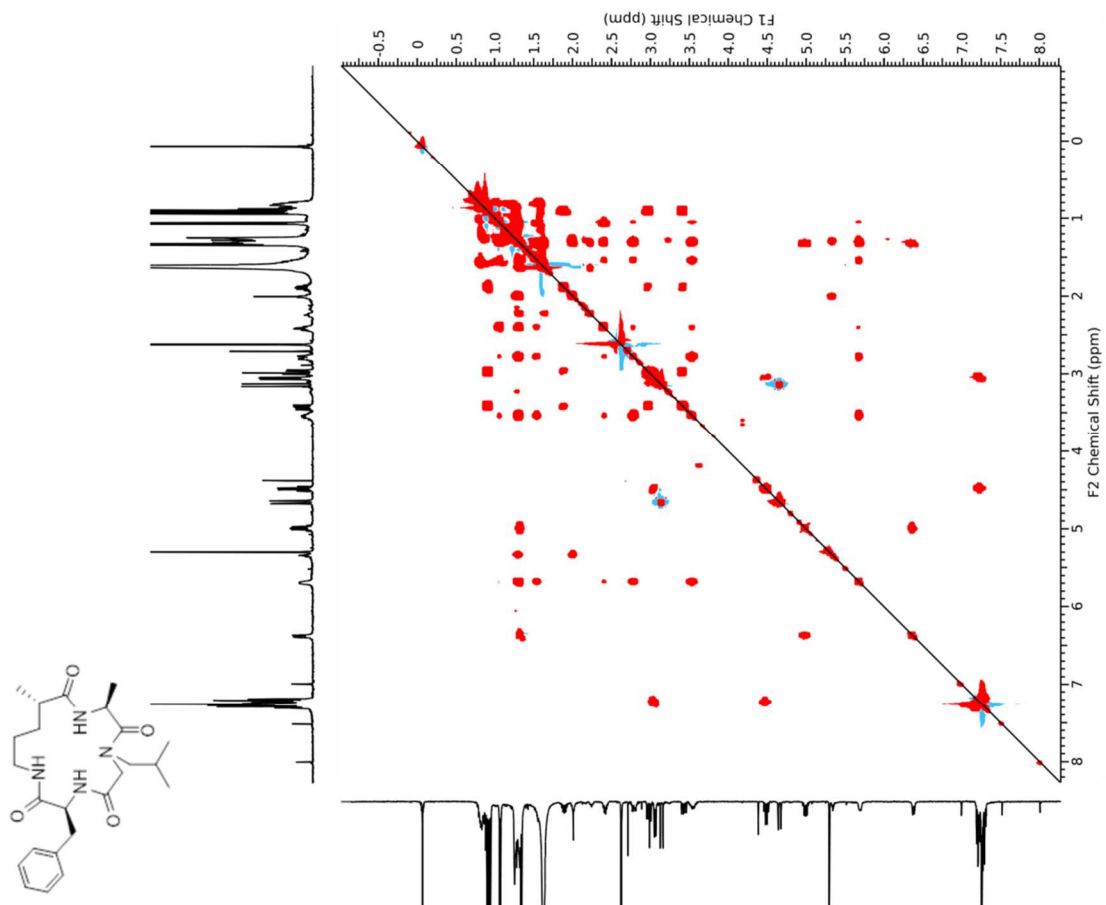
DMSO – ROESY



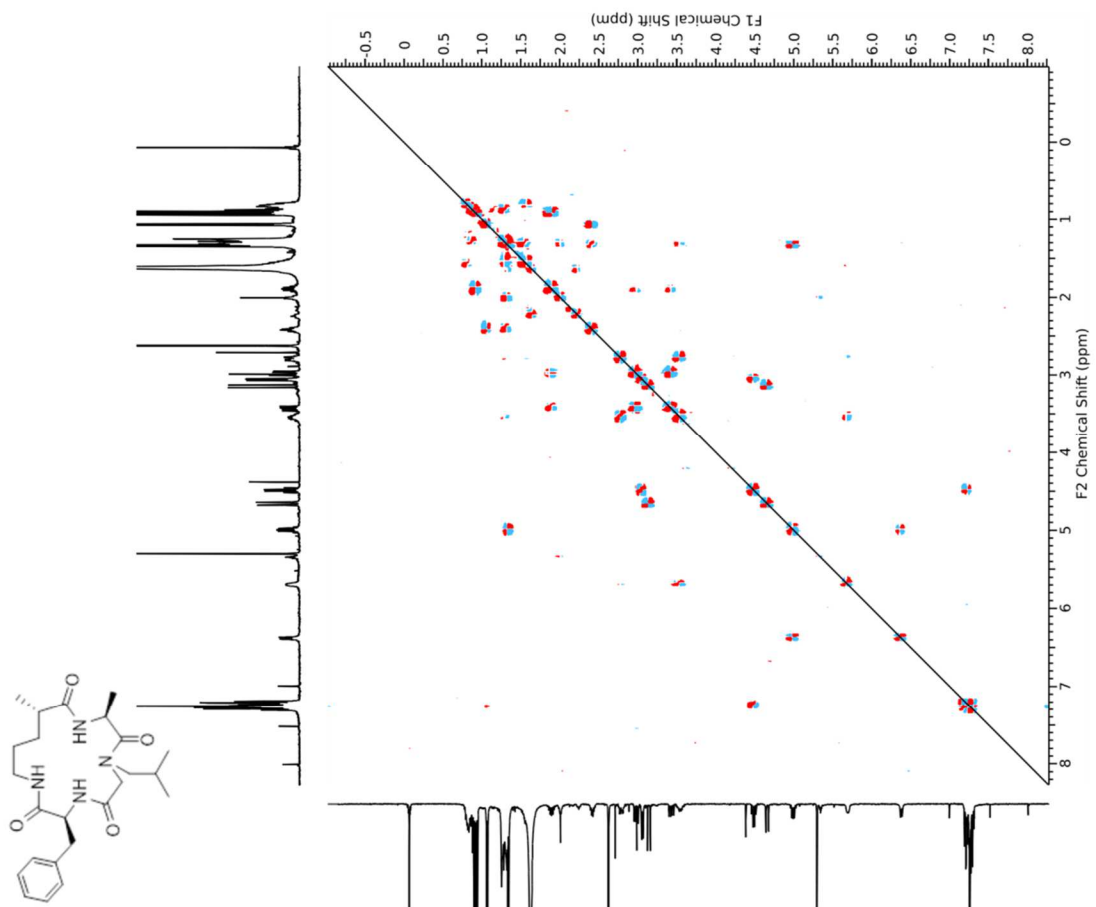
CDCl₃ – ¹H



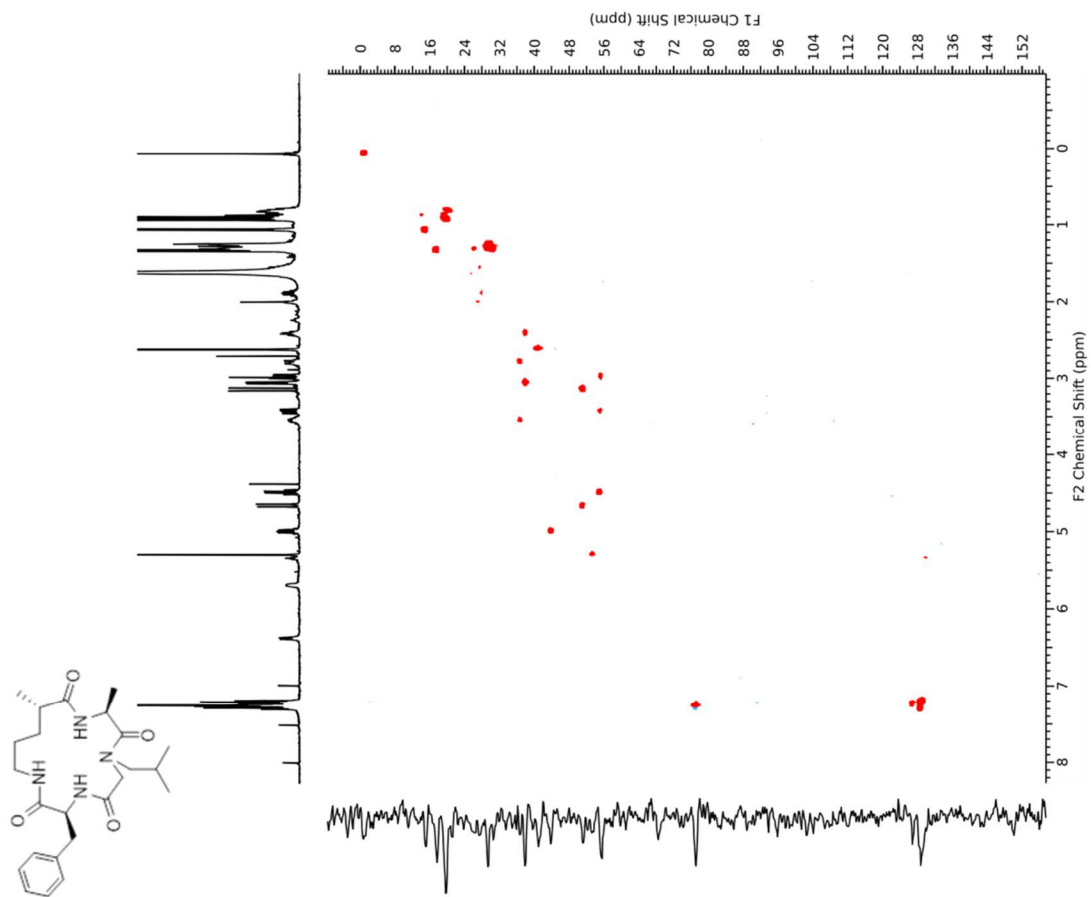
CDCl₃ – TOCSY



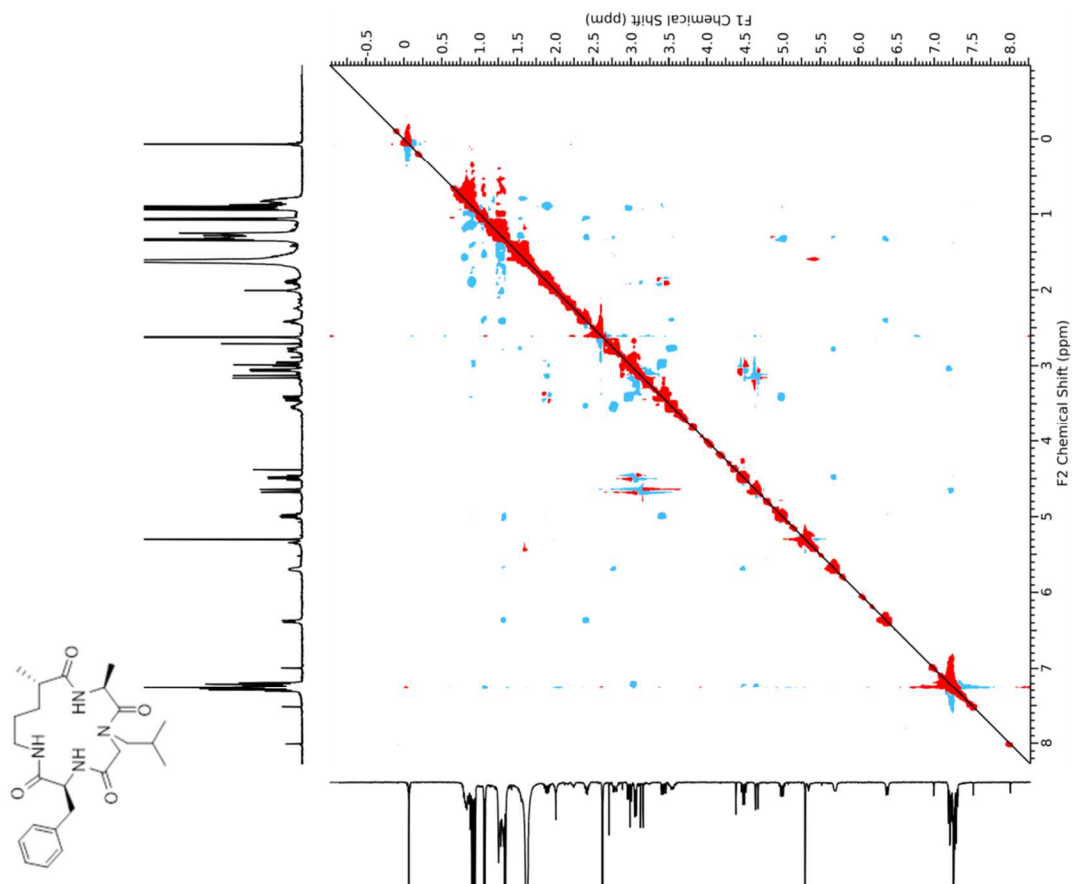
CDCl₃ – COSY



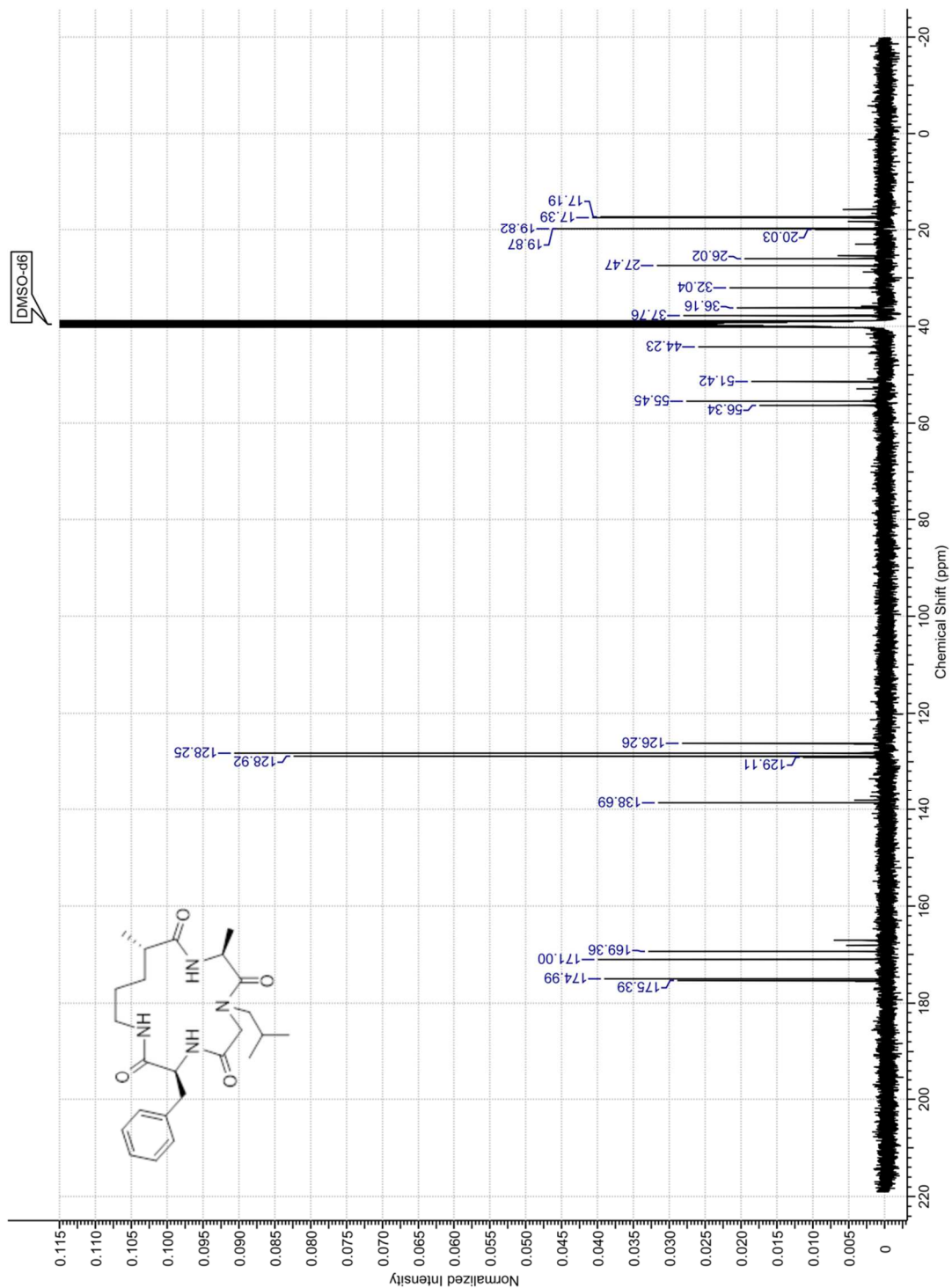
CDCl₃ – HSQC



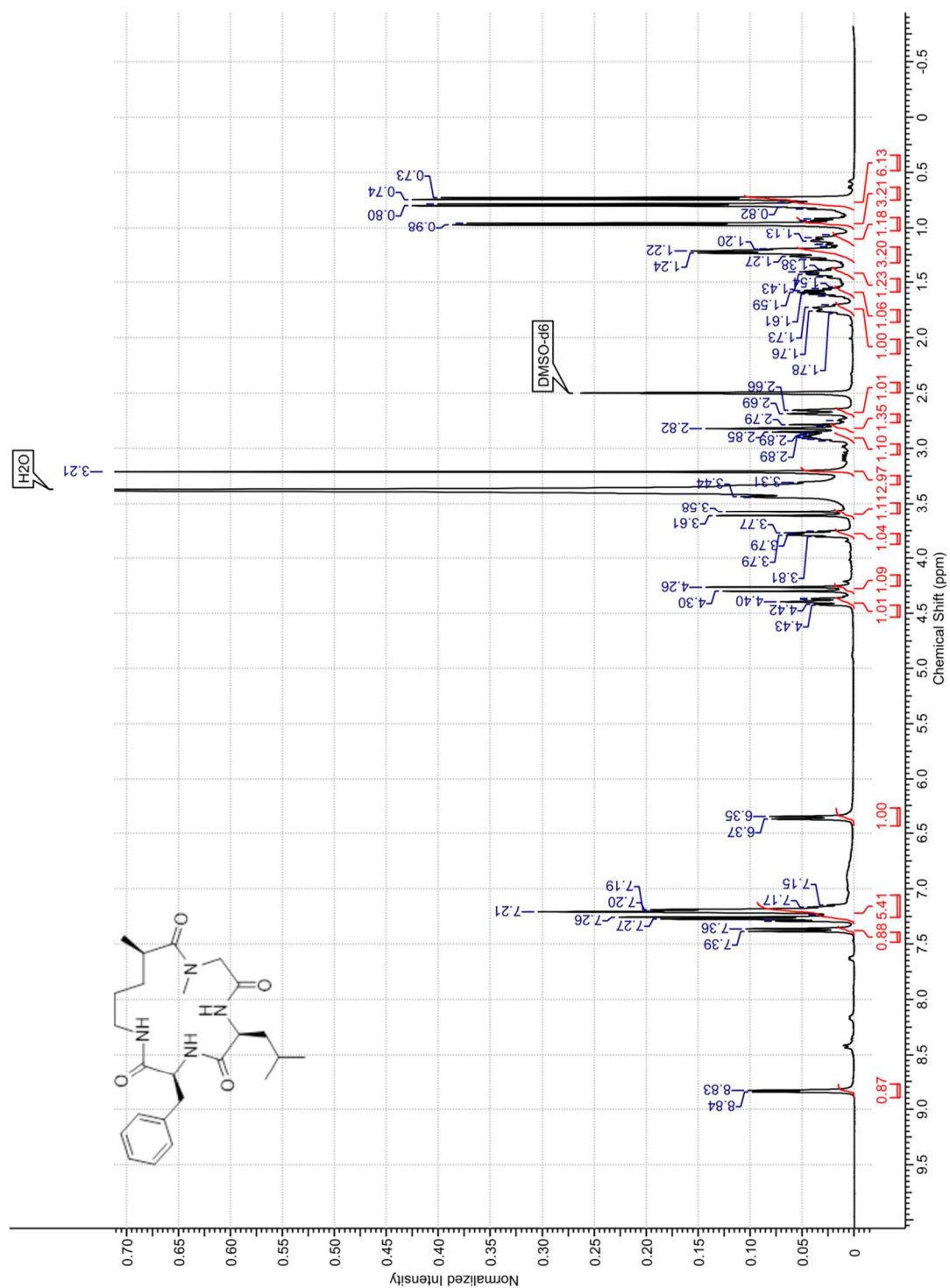
CDCl₃ – ROESY

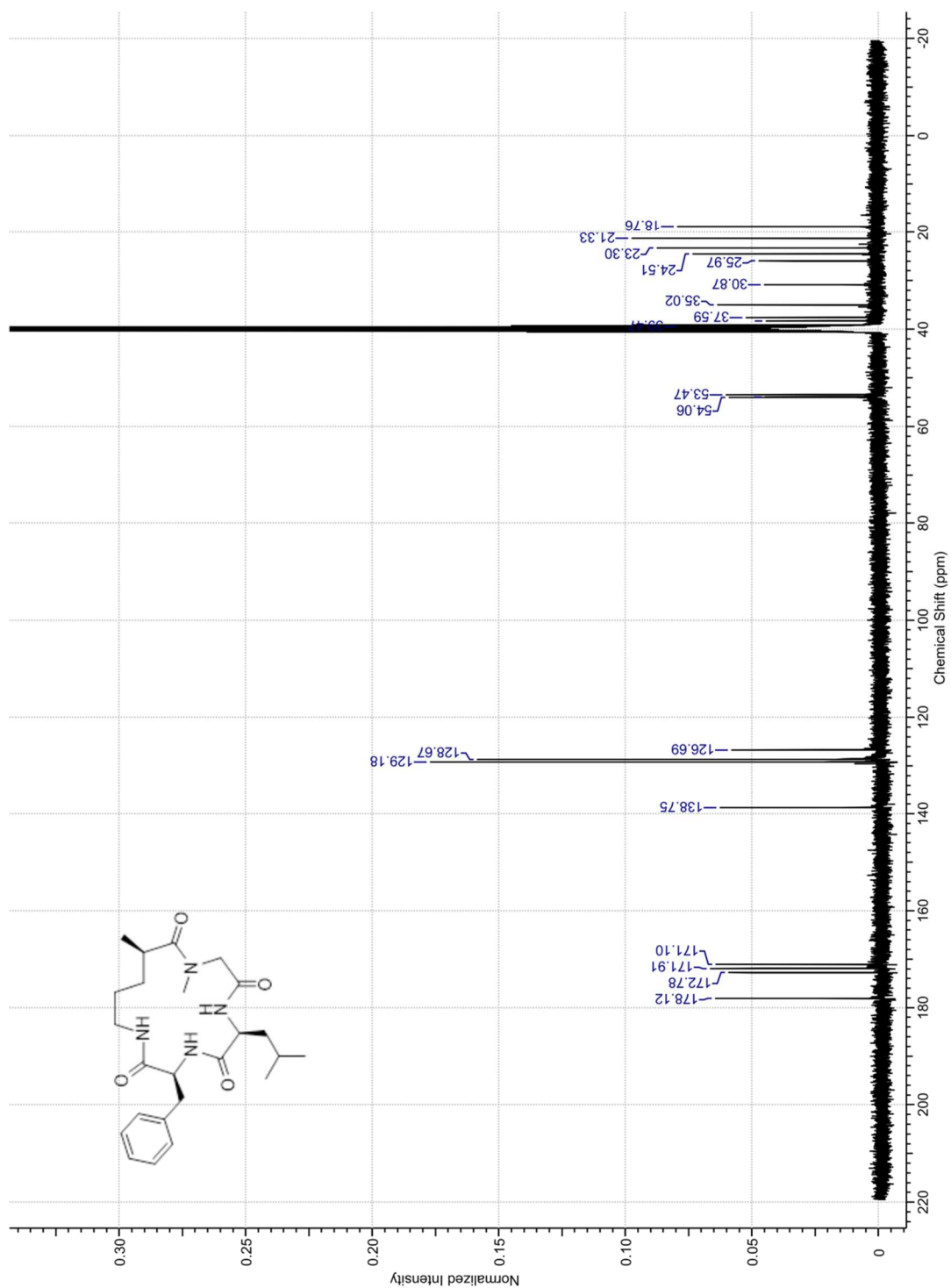


DMSO - ^{13}C

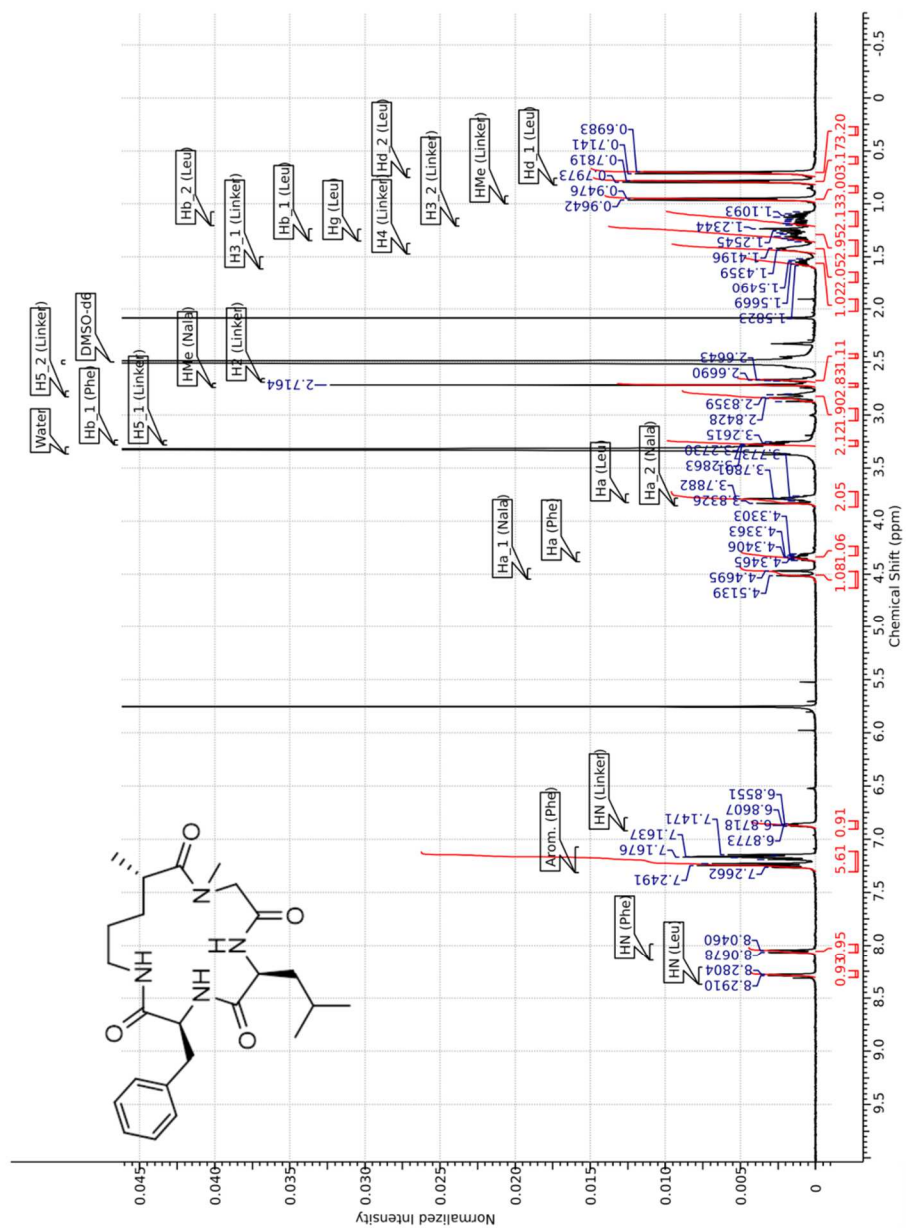


(3*S*,6*S*,12*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-12-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nala-2*R*) (42)

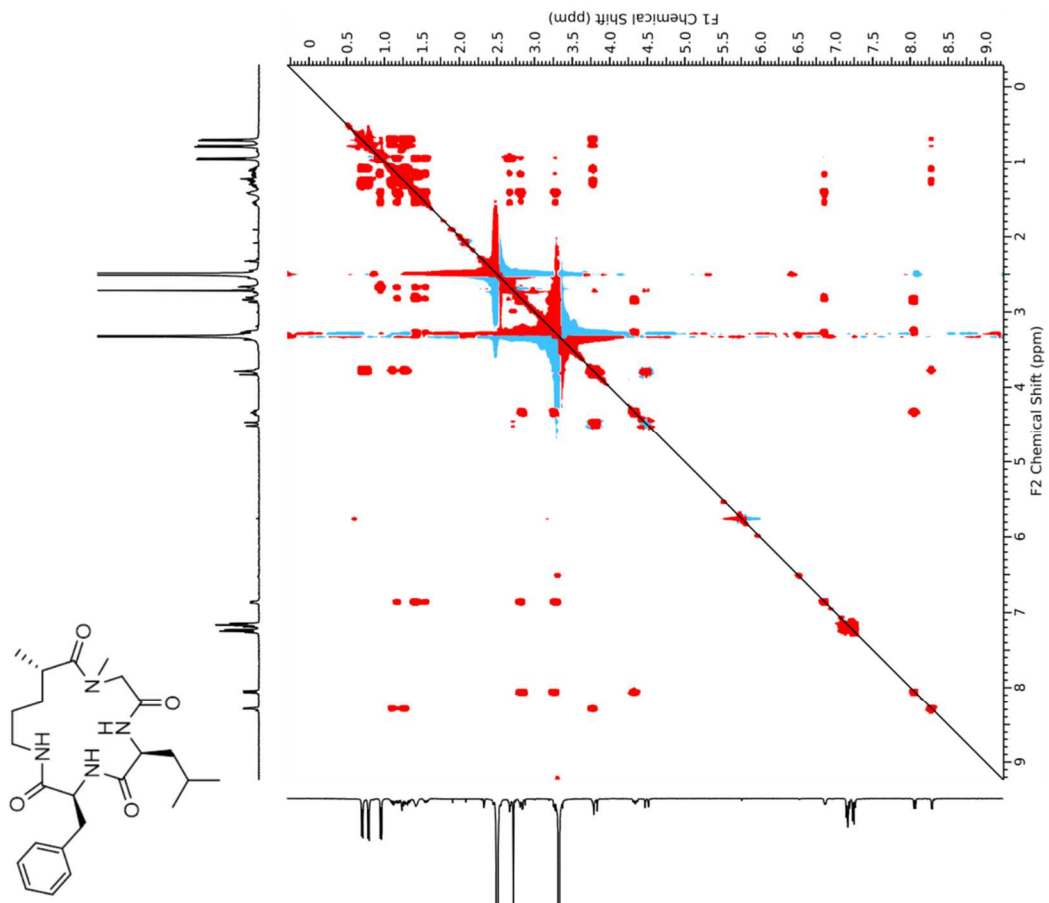




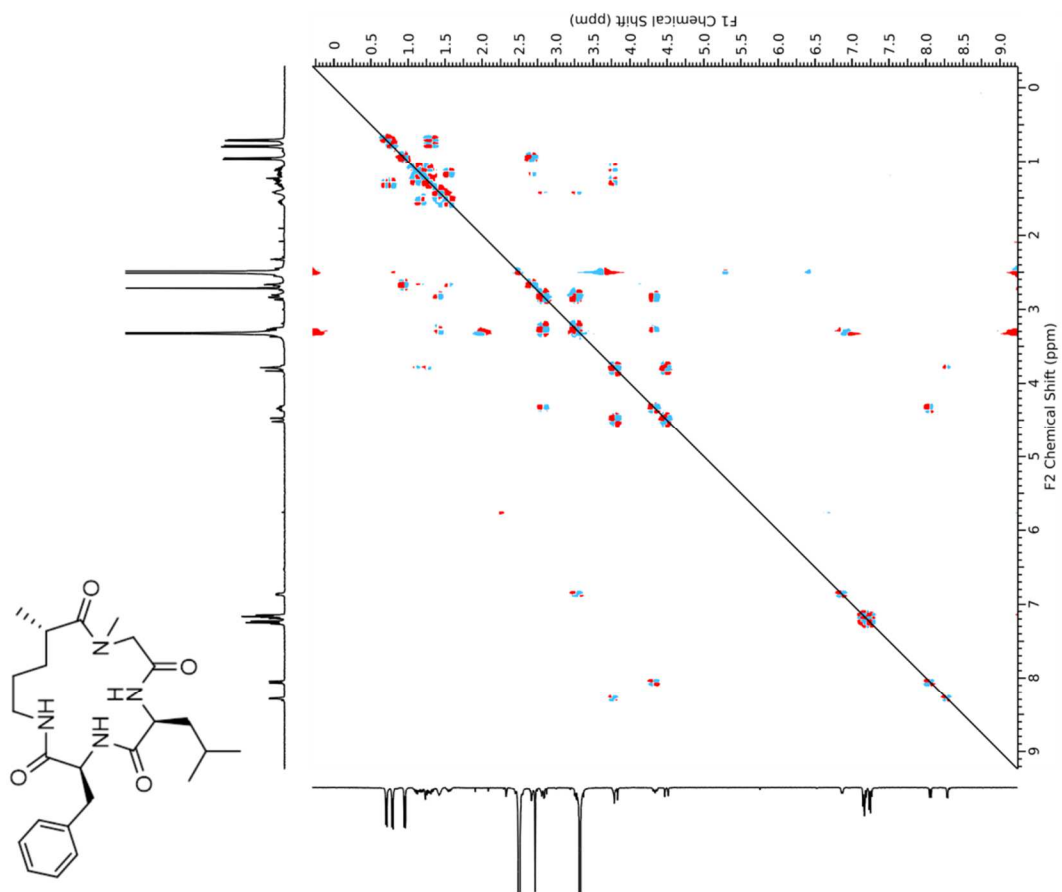
DMSO – ¹H



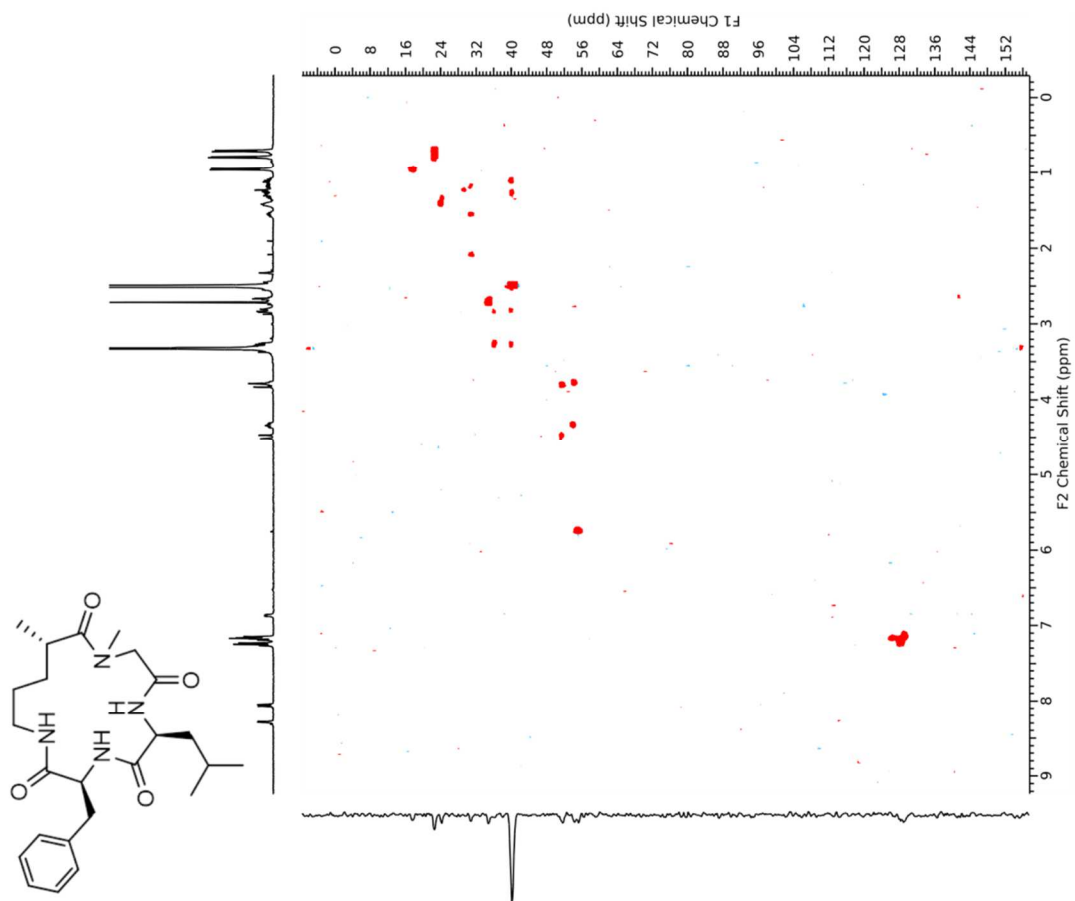
DMSO – TOCSY



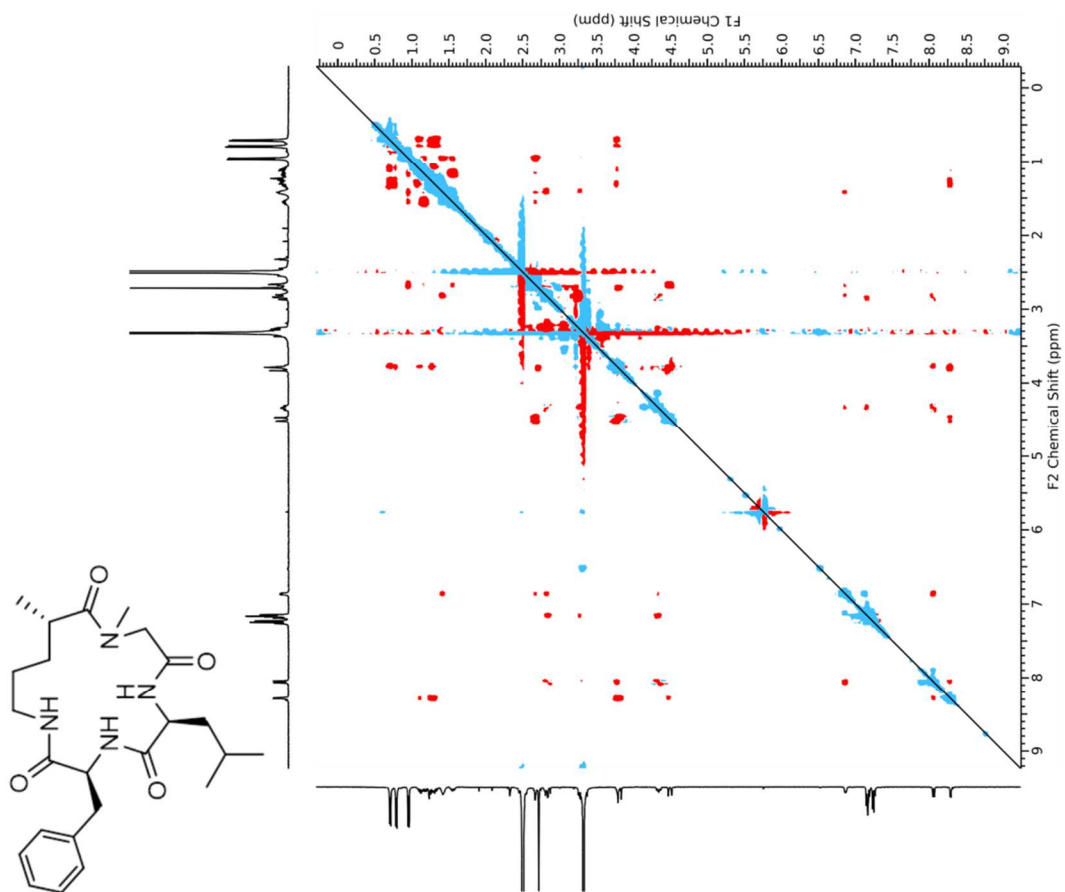
DMSO – COSY



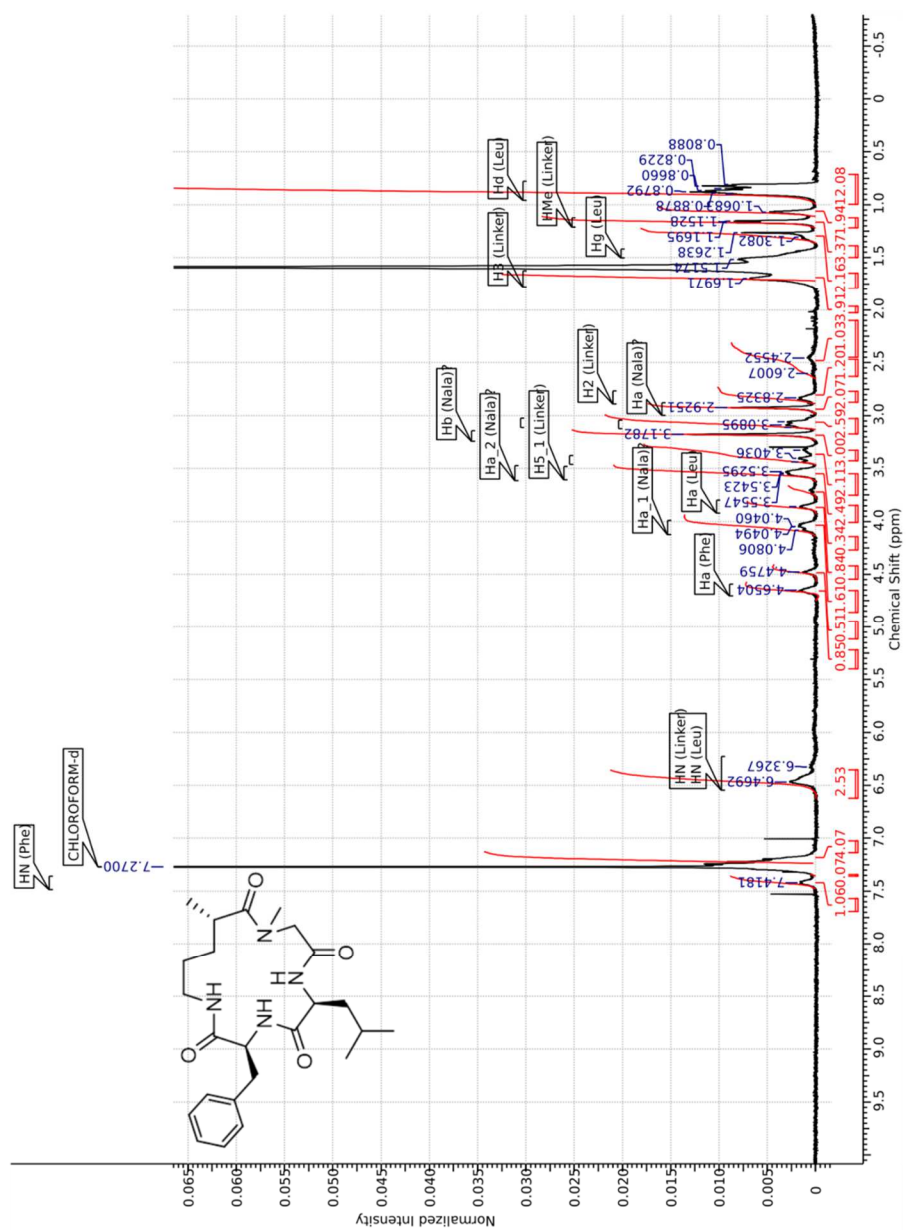
DMSO - HSQC



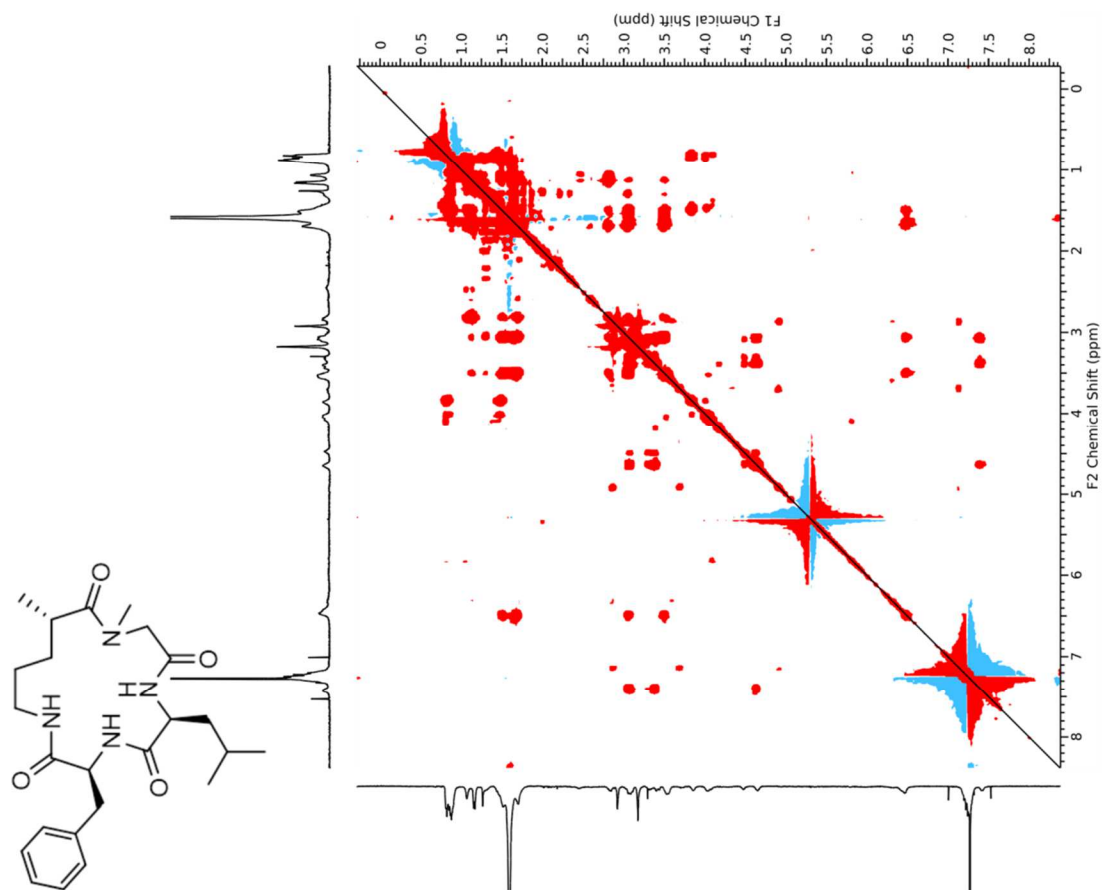
DMSO – ROESY



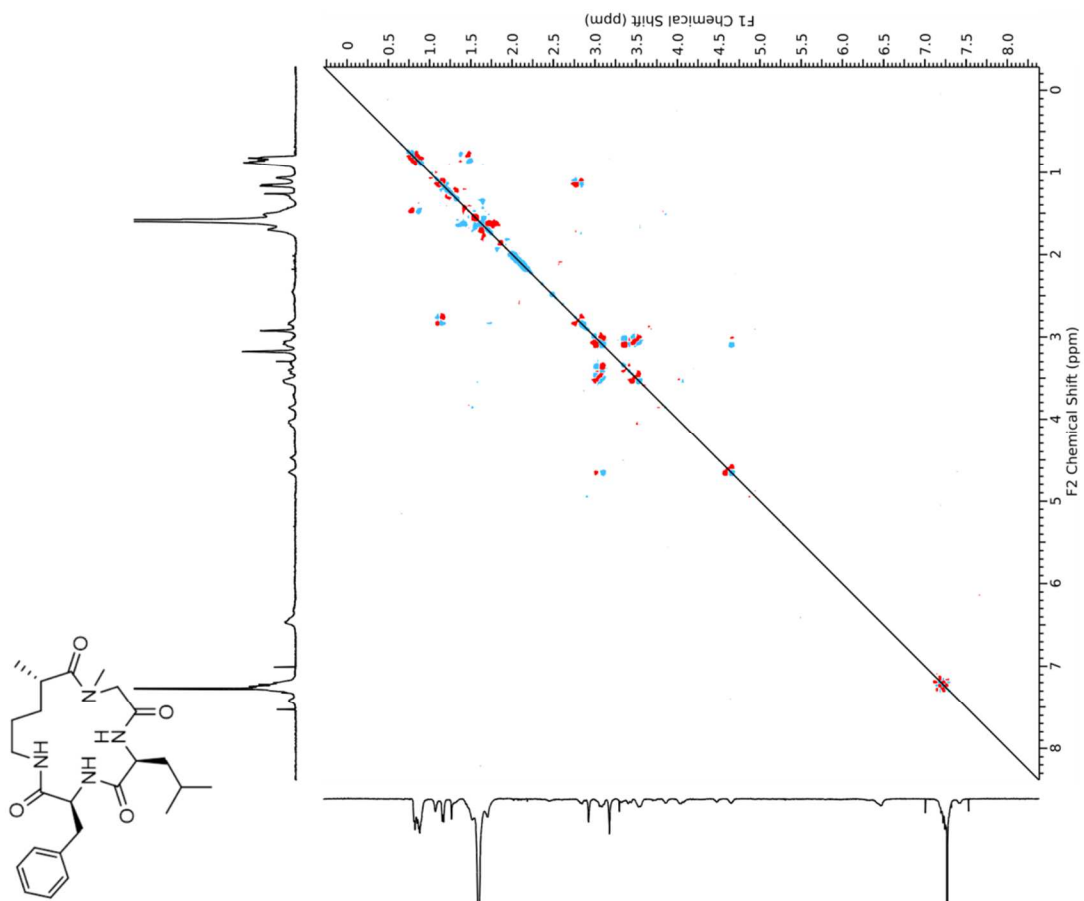
CDCl₃ – ¹H



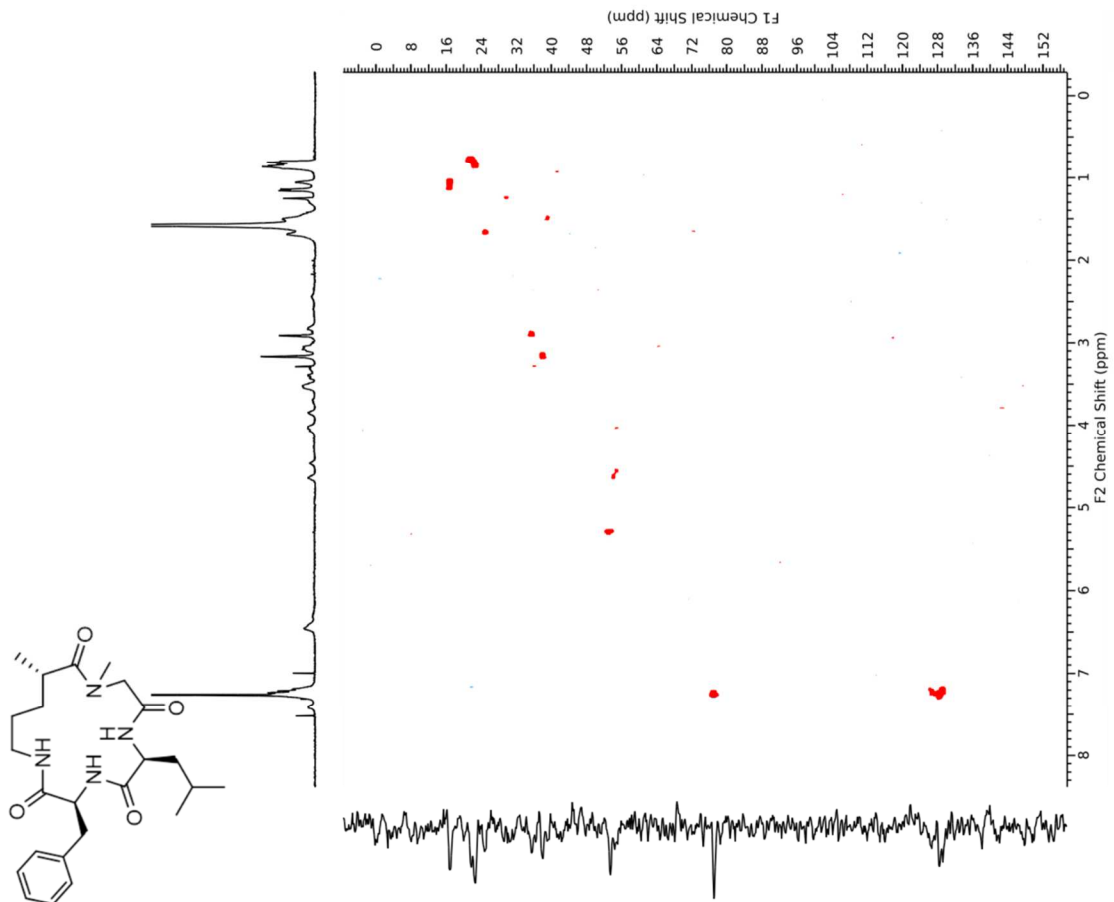
CDCl₃ – TOCSY



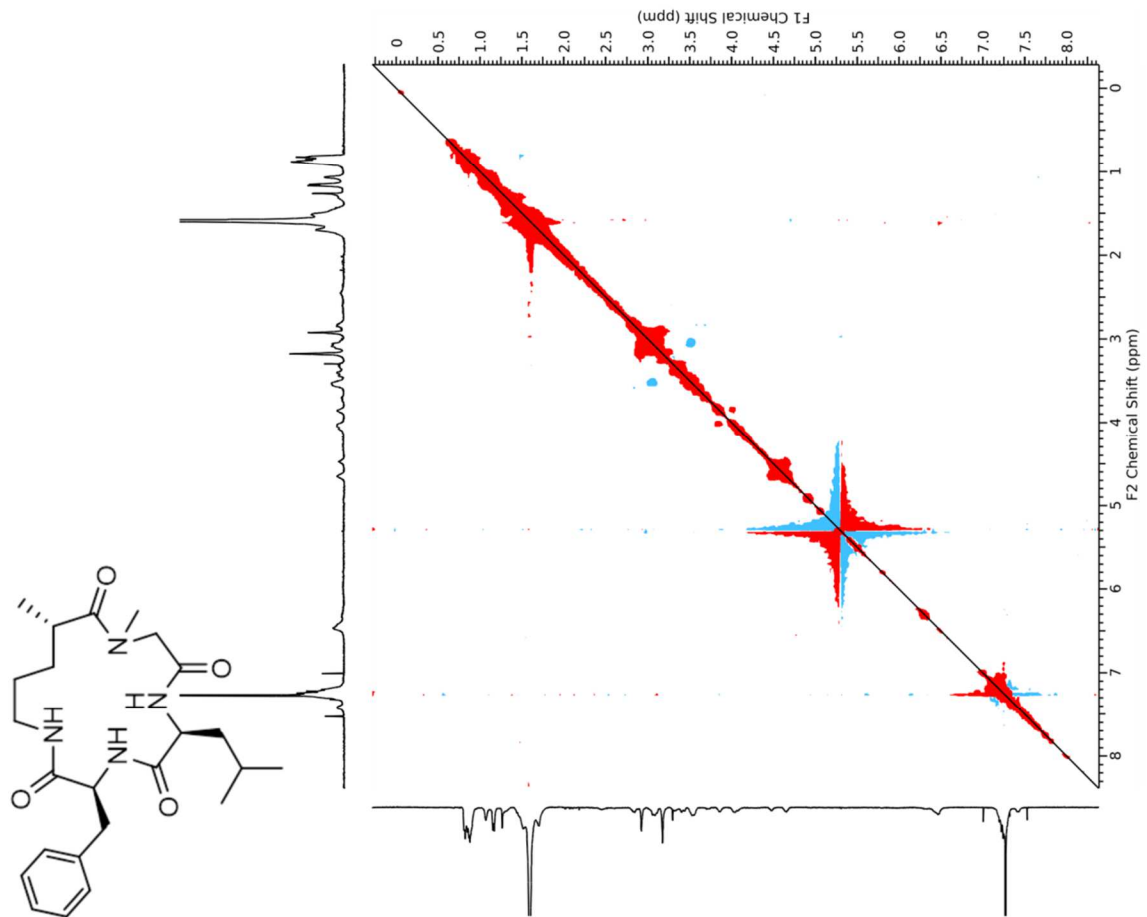
CDCl₃ – COSY



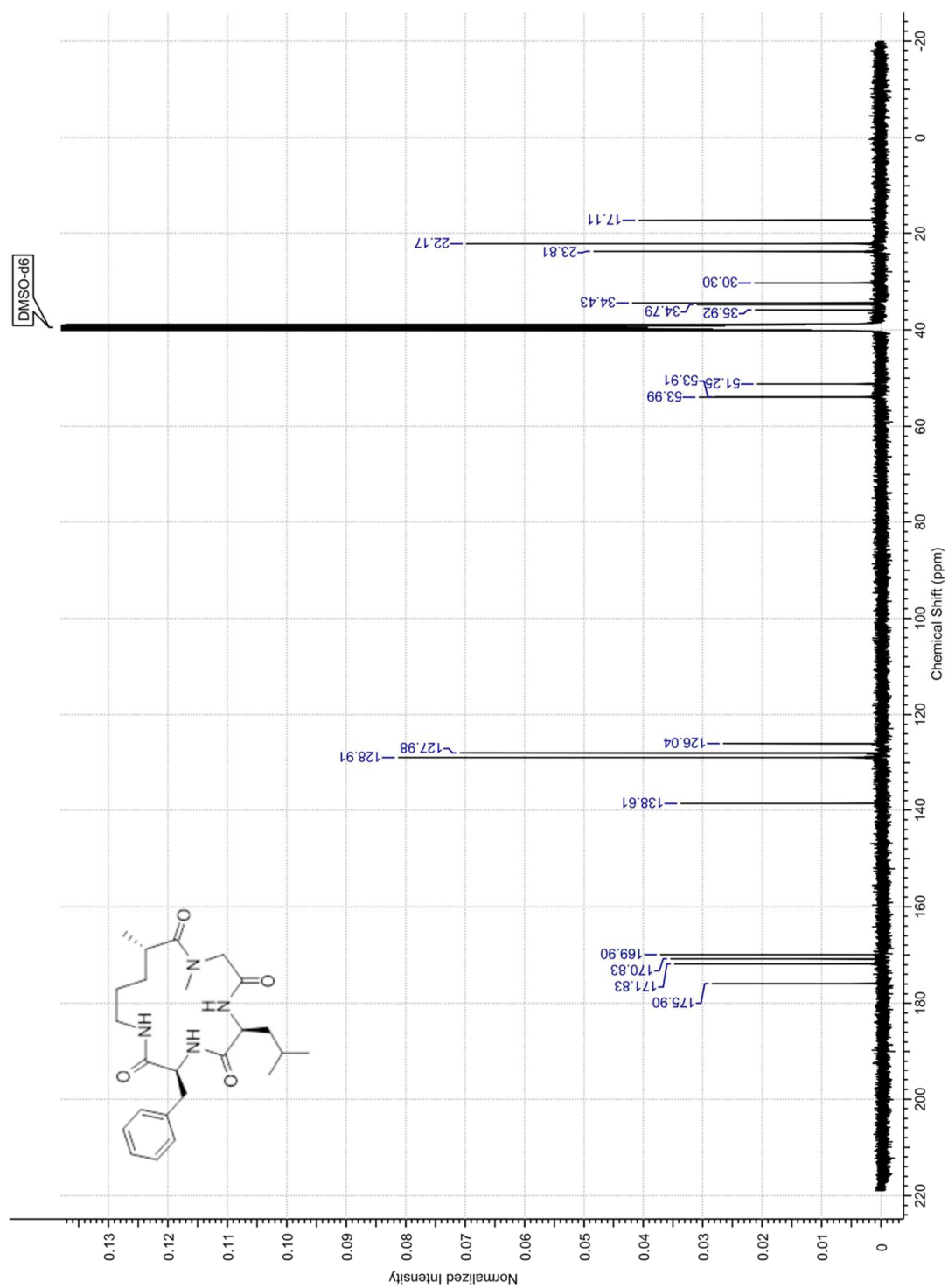
CDCl₃ – HSQC



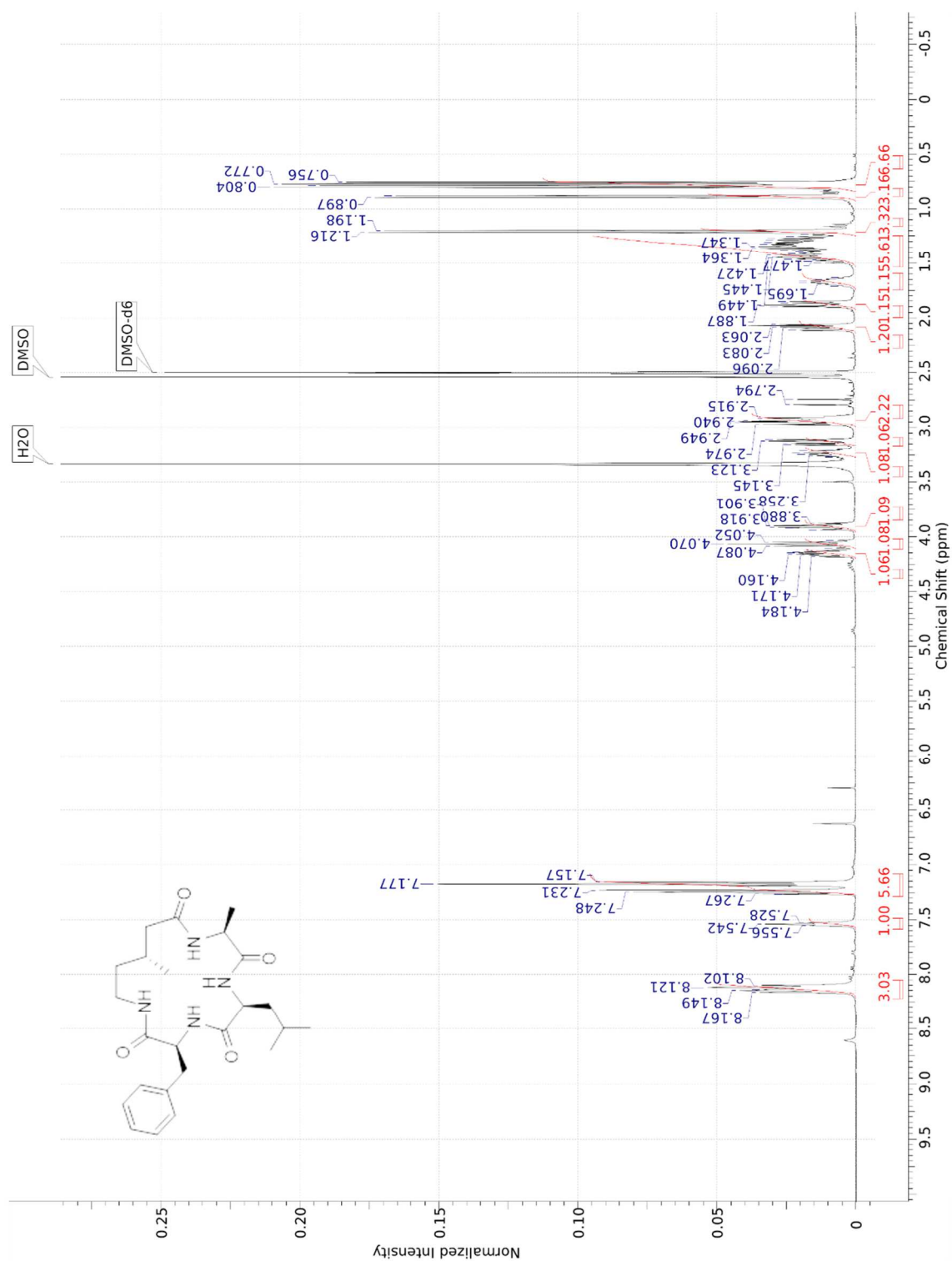
CDCl₃ – ROESY



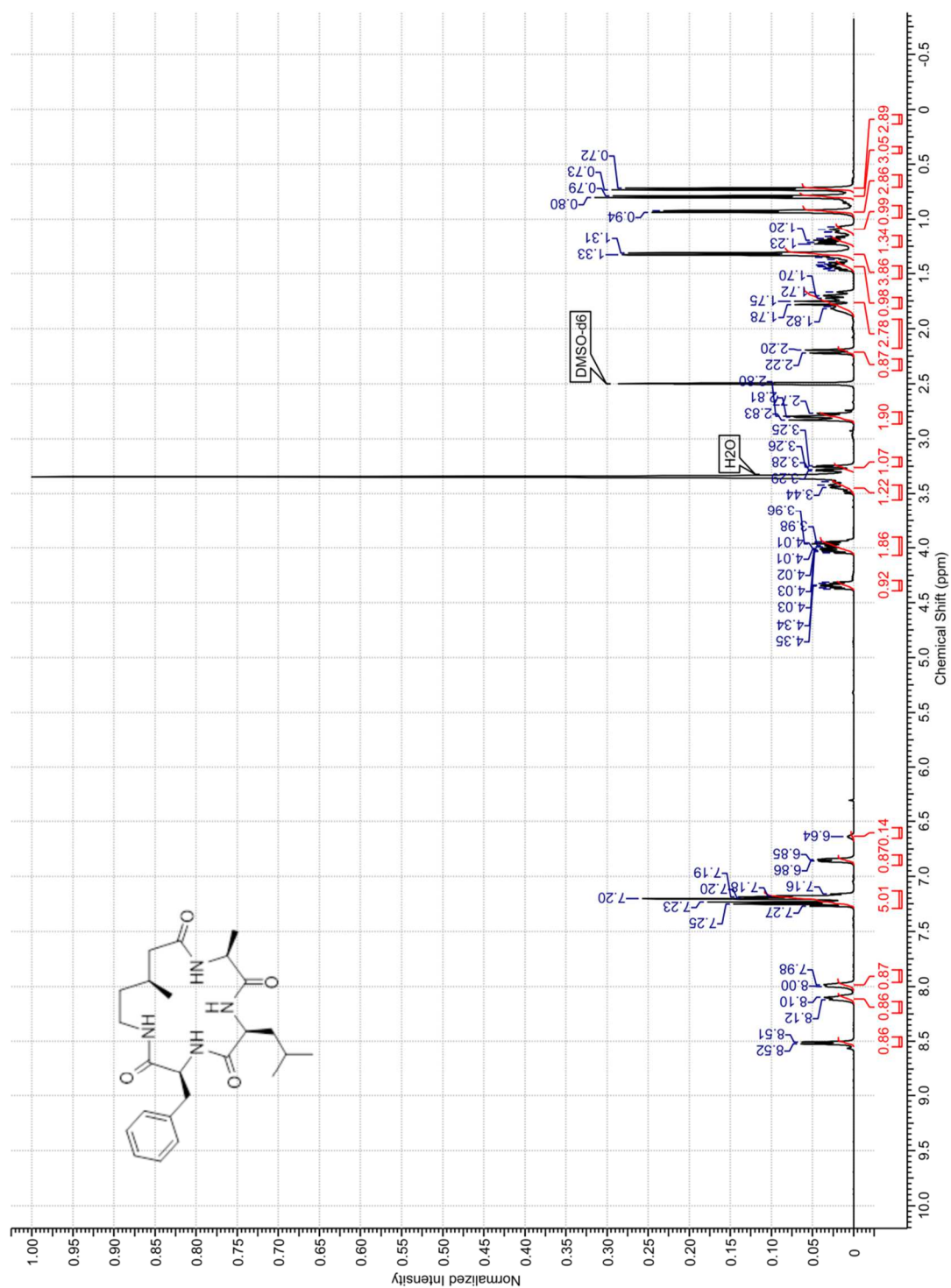
DMSO - ^{13}C

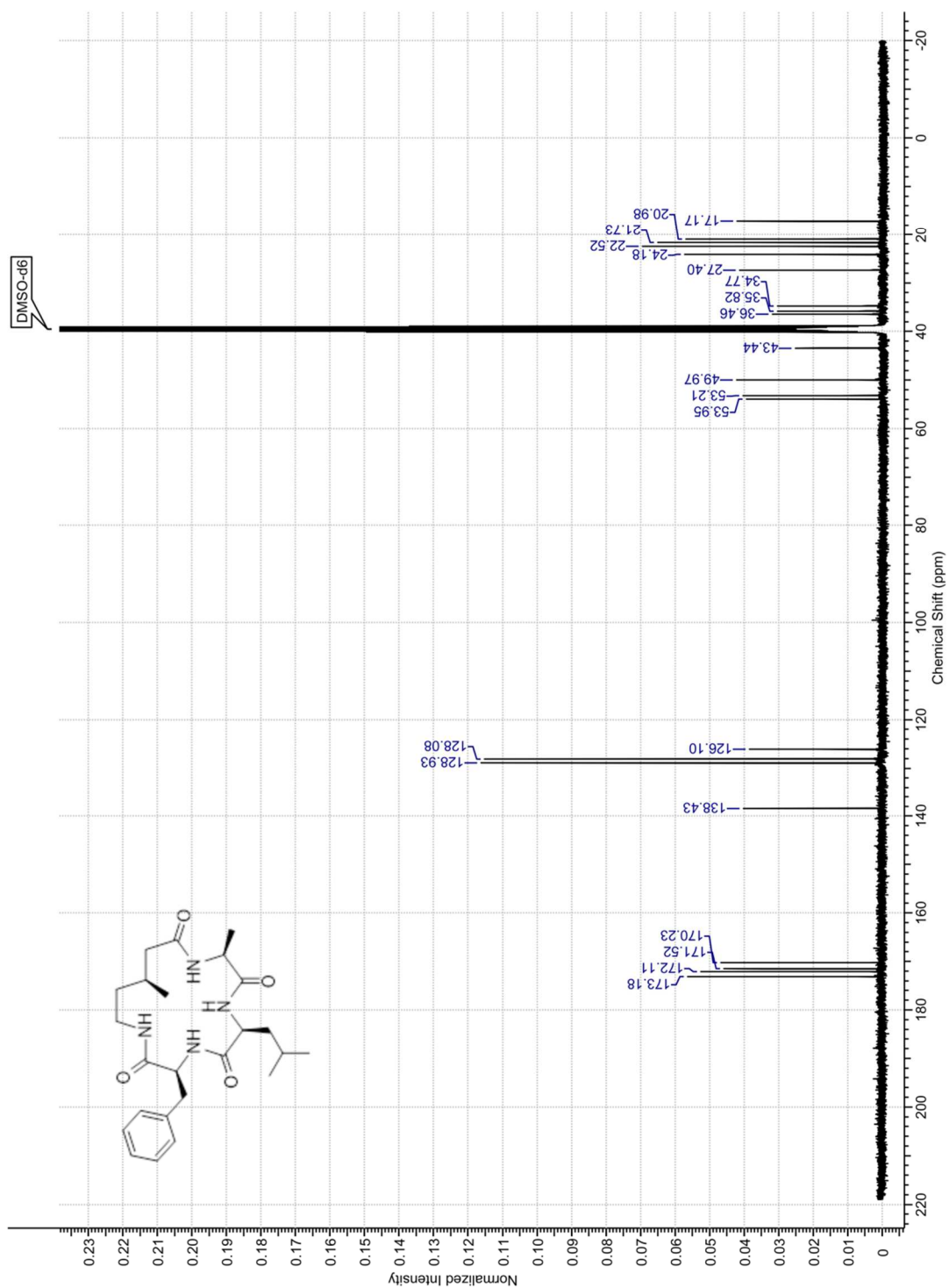


(3*S*,6*S*,9*S*,13*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,13-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Ø-3R) (44)

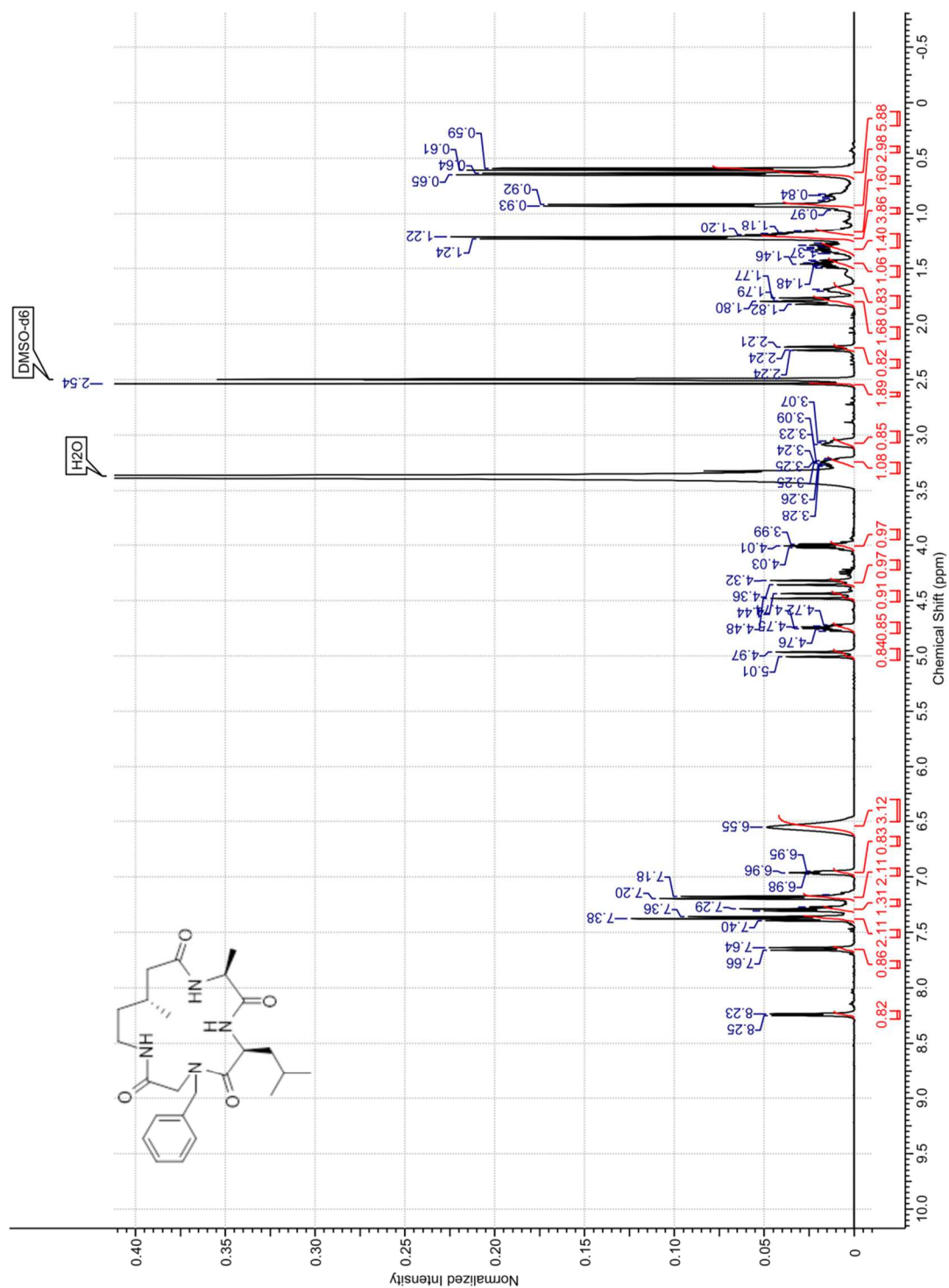


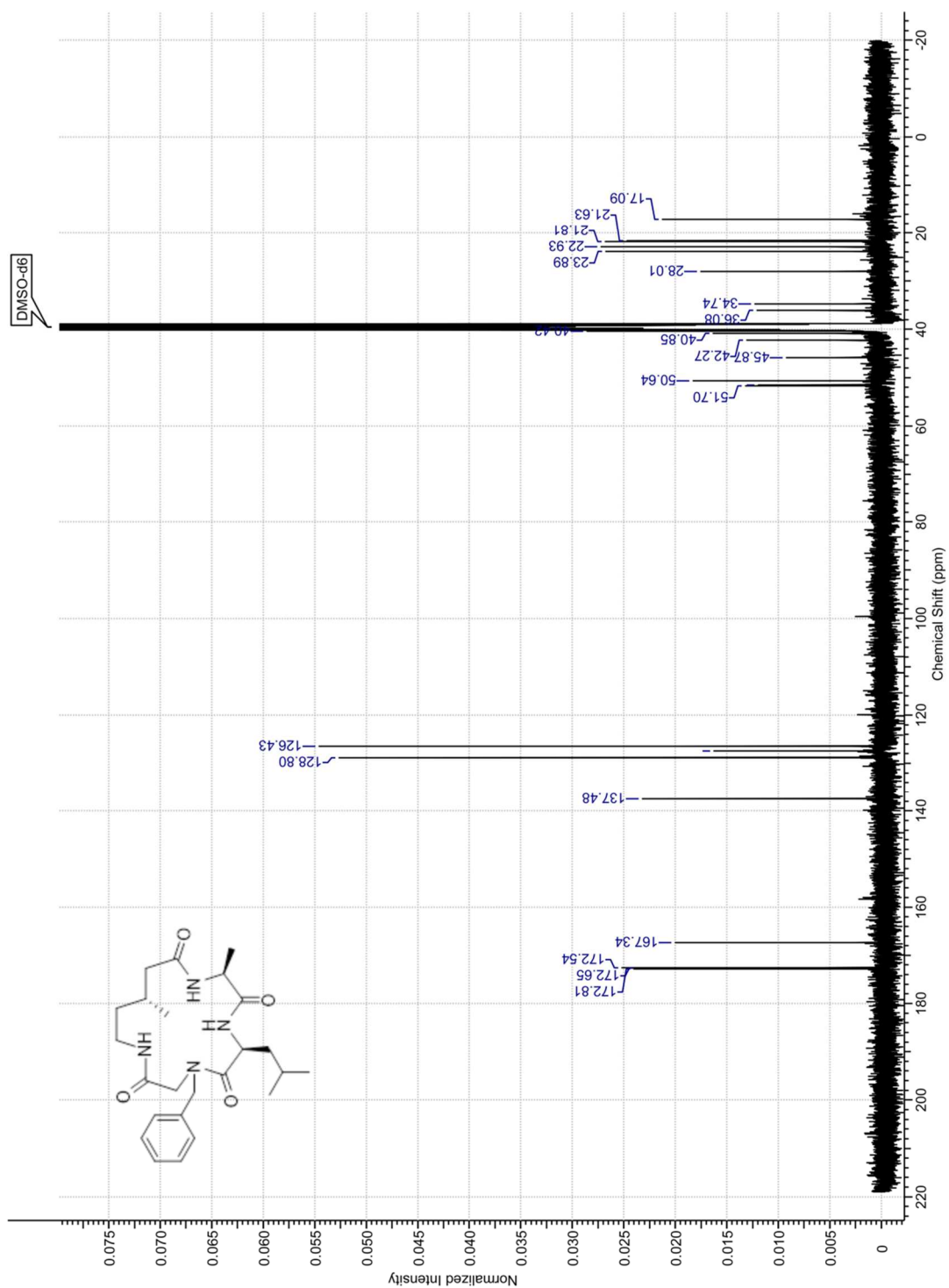
(3*S*,6*S*,9*S*,13*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,13-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Ø-3*S*) (45)



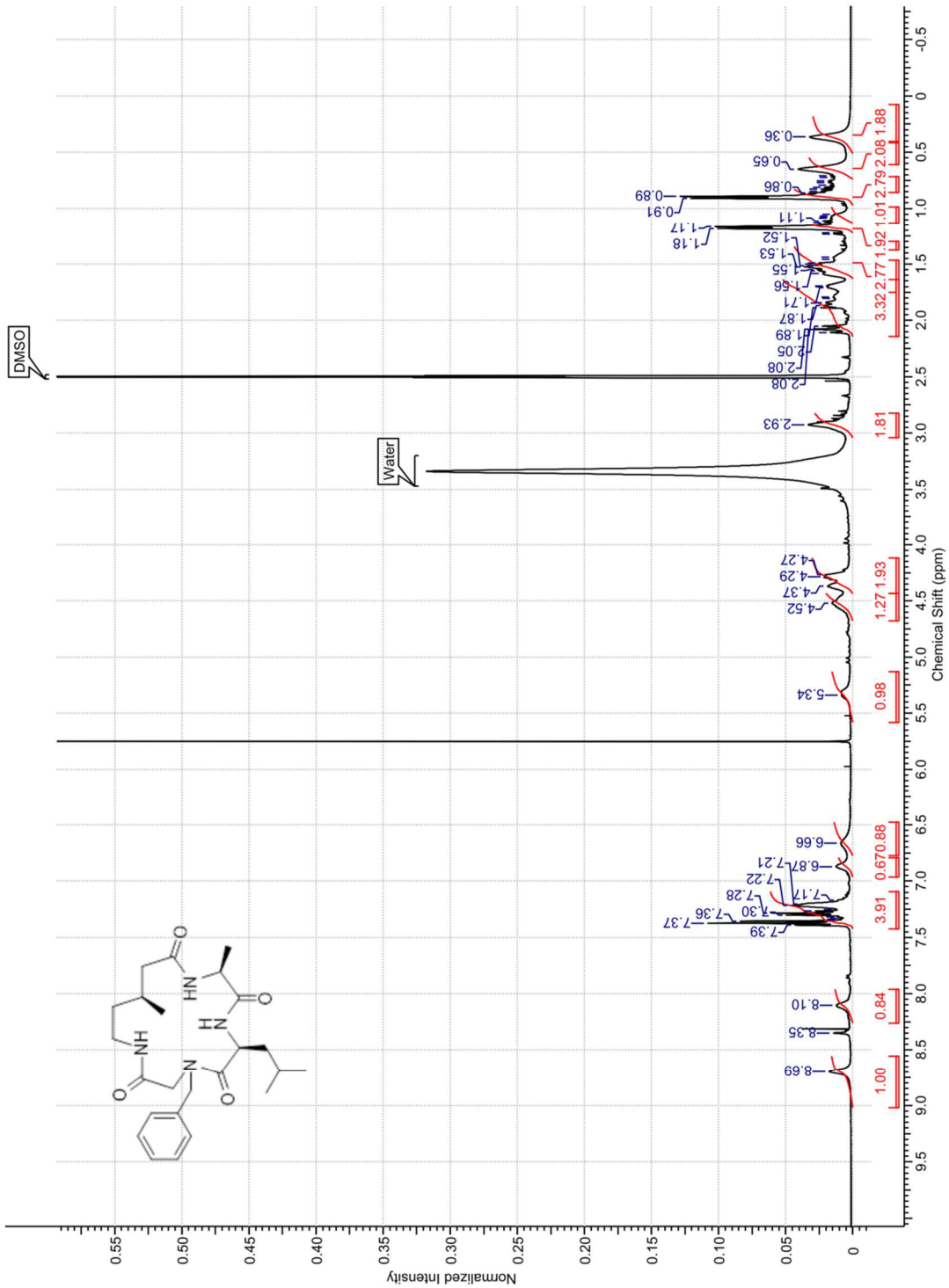


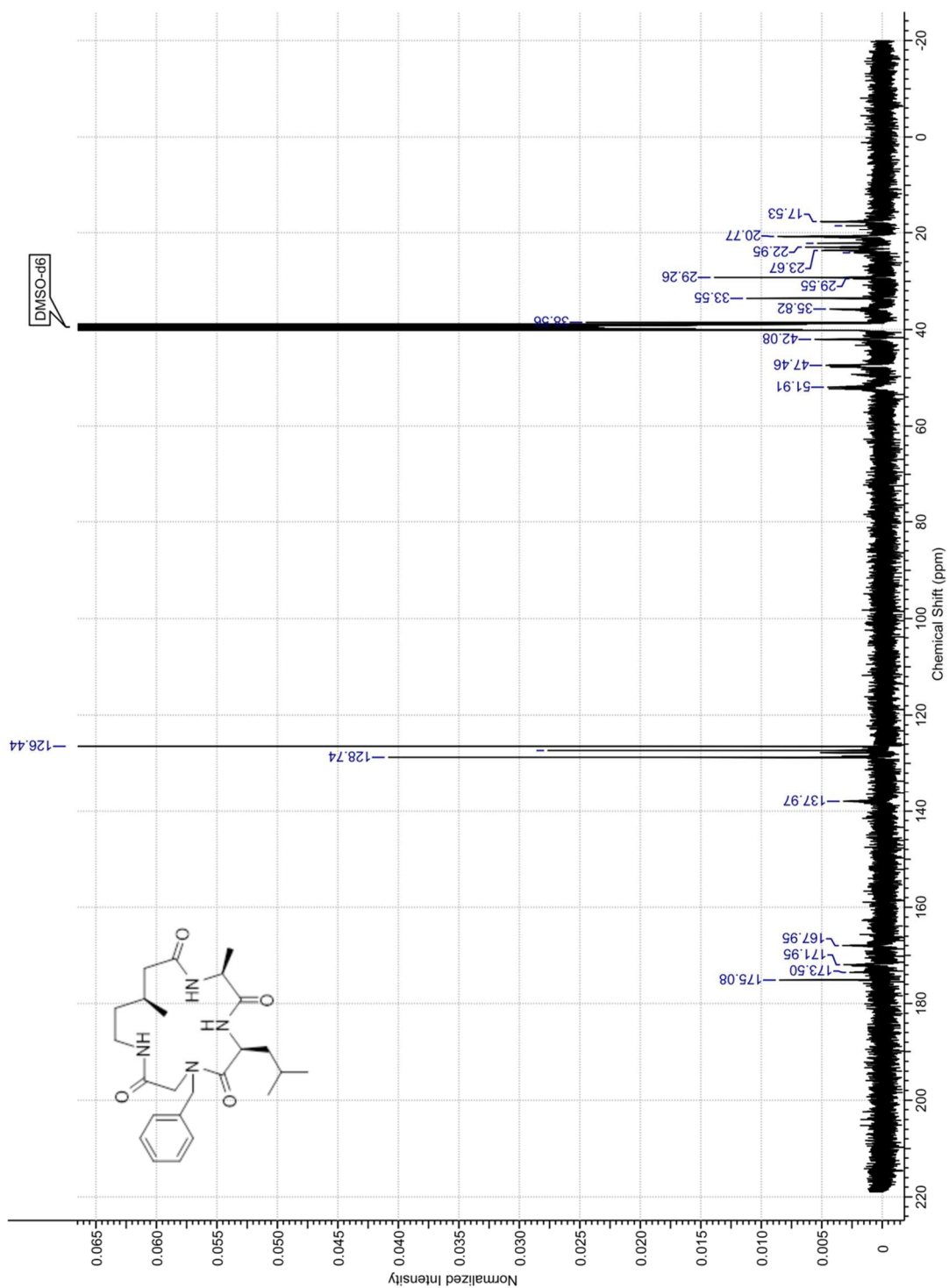
(6*S*,9*S*,13*R*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,13-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Nphe-3*R*) (46)



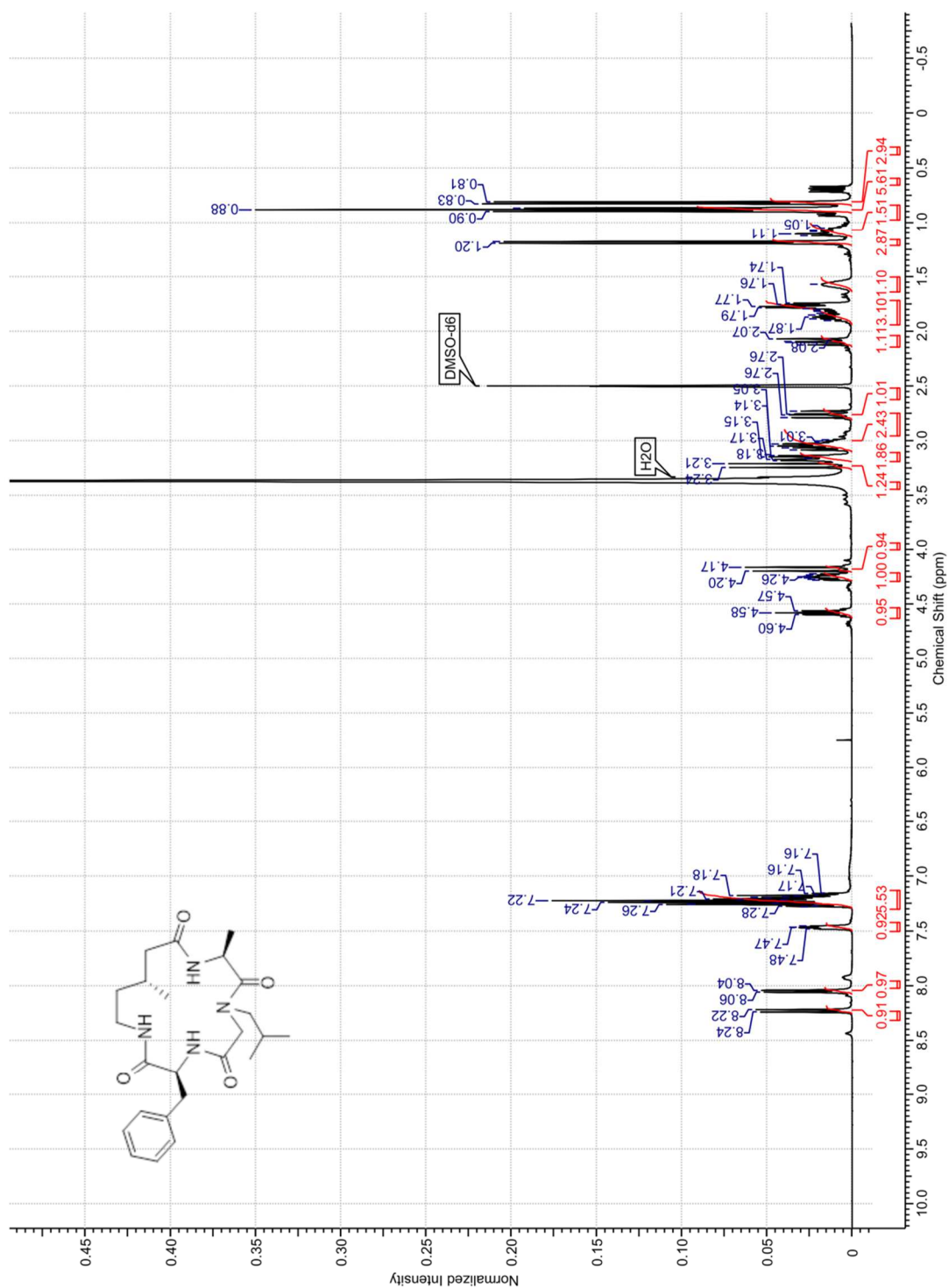


(6*S*,9*S*,13*S*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,13-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nphe-3*S*) (47)

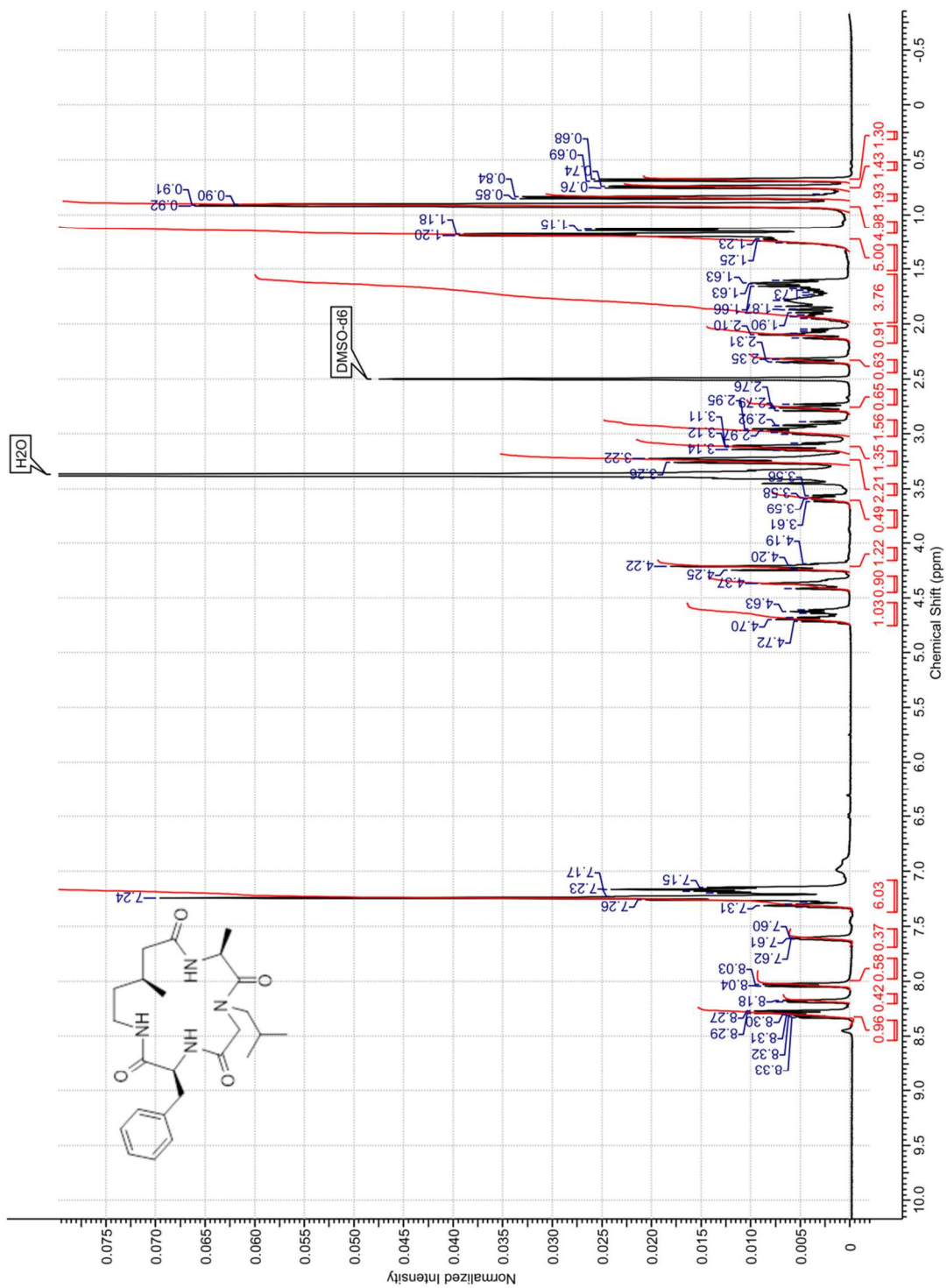




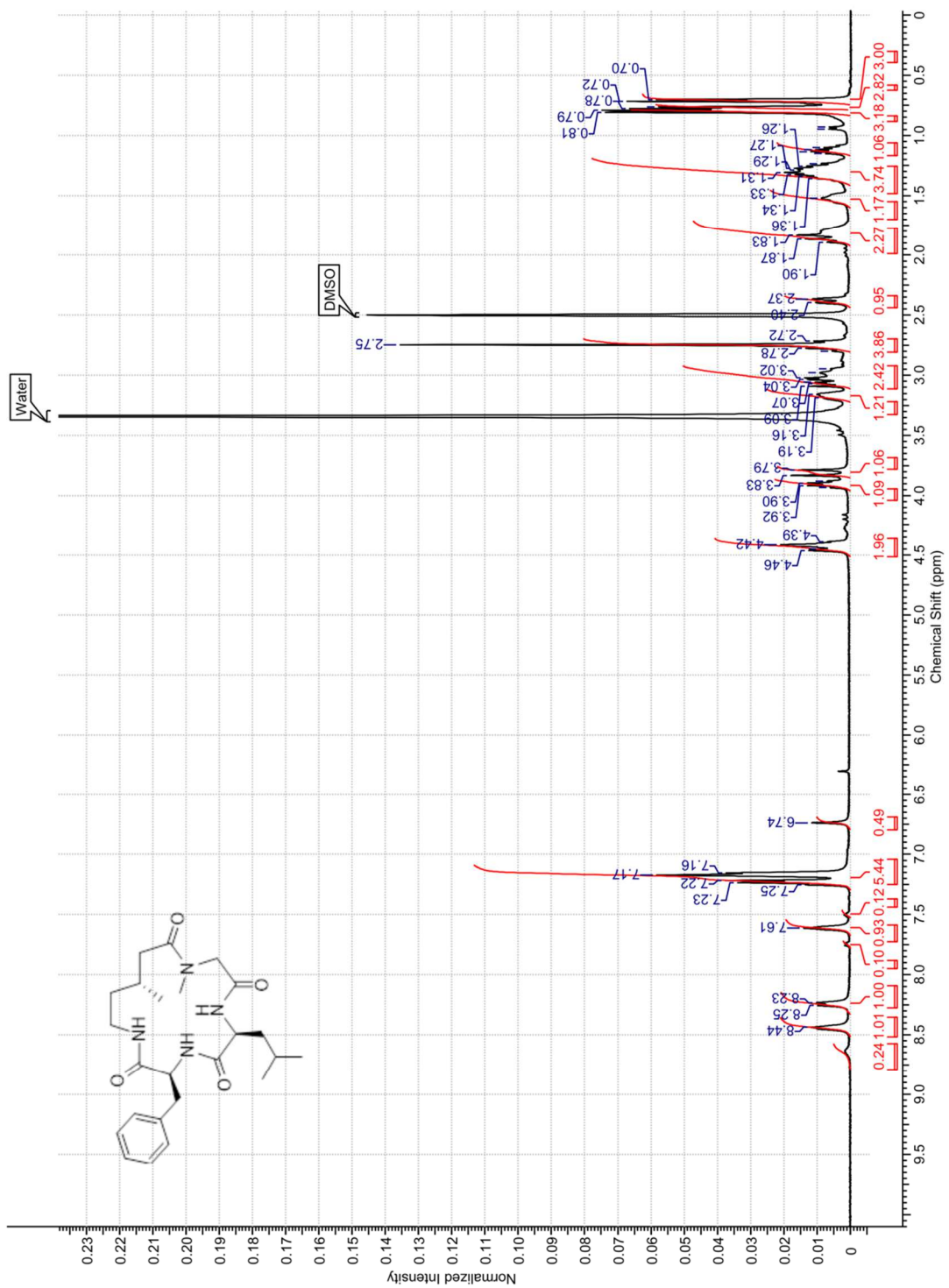
(3*S*,9*S*,13*R*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,13-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Nleu-3R) (48)



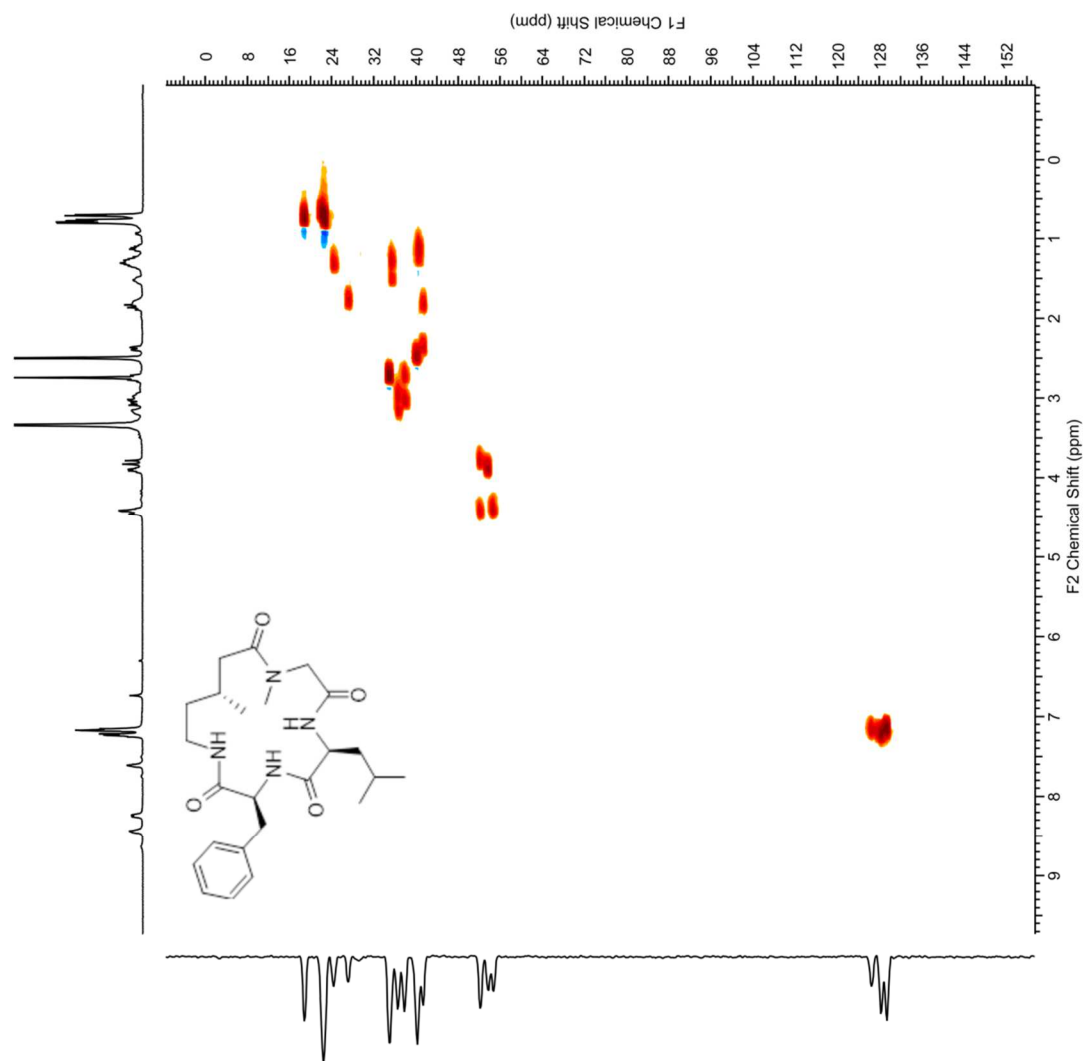
(3*S*,9*S*,13*S*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,13-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Nleu-3*S*) (49)



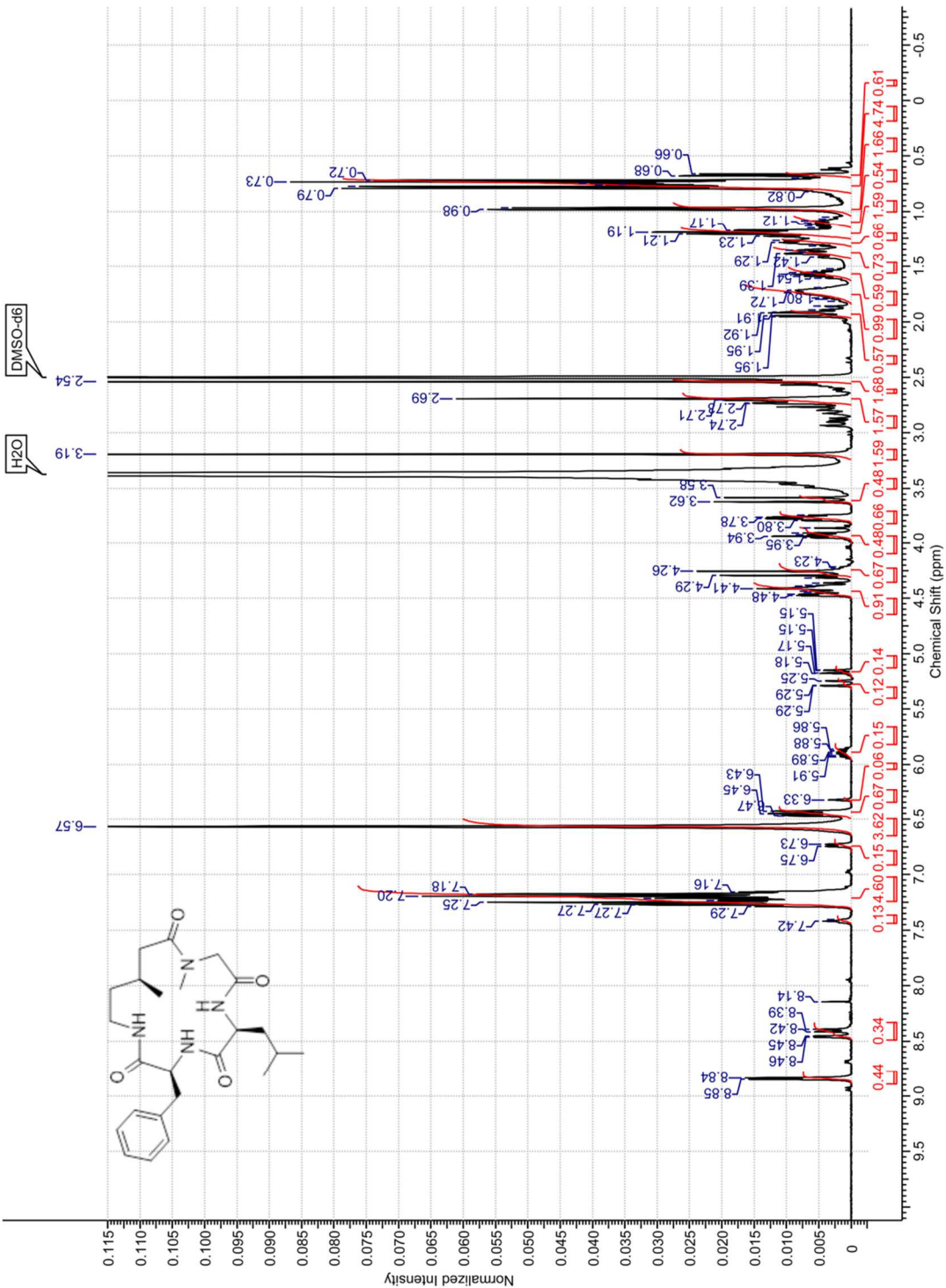
(3*S*,6*S*,13*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-13-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Nala-3*R*) (50)

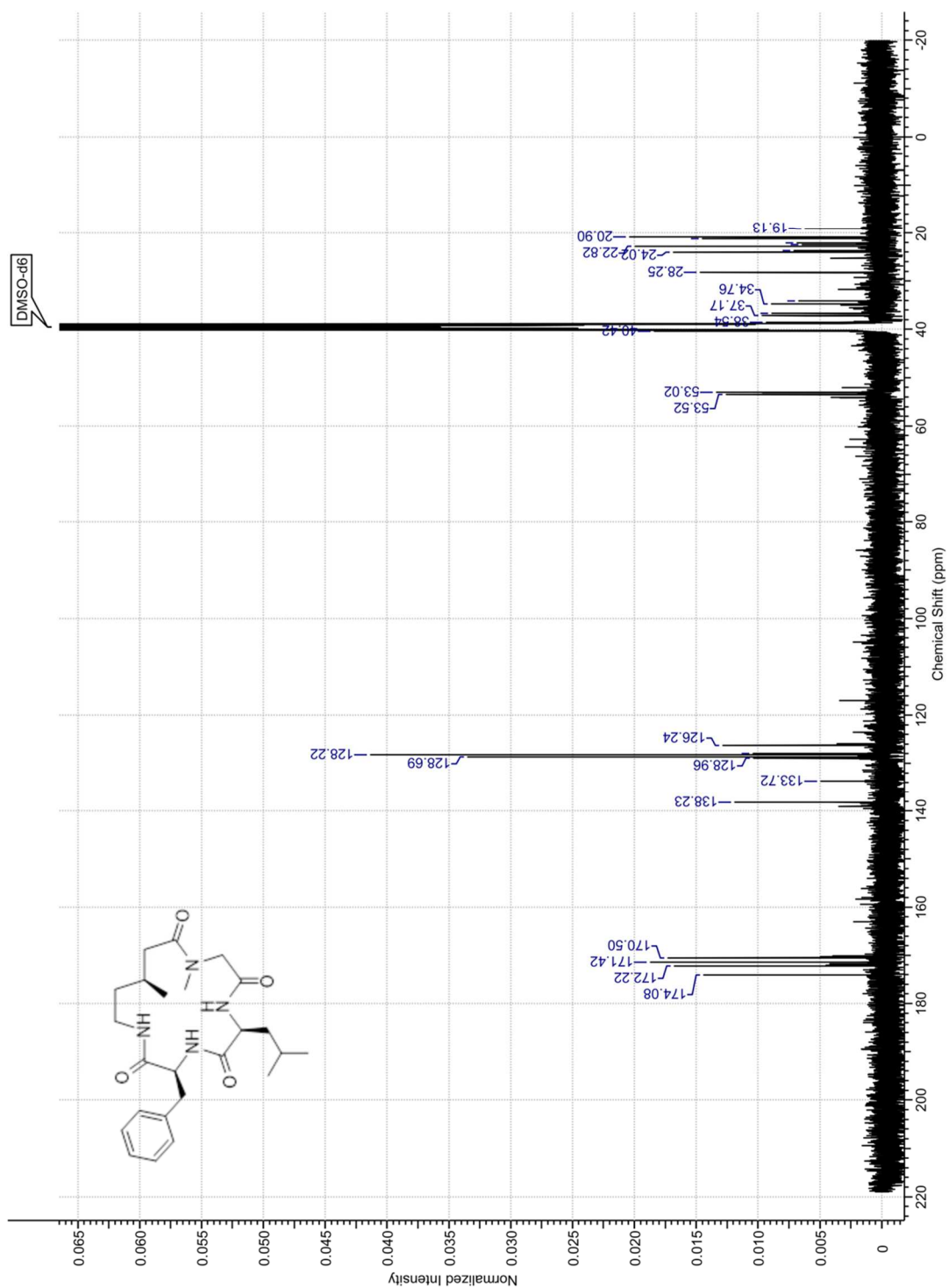


HSQC

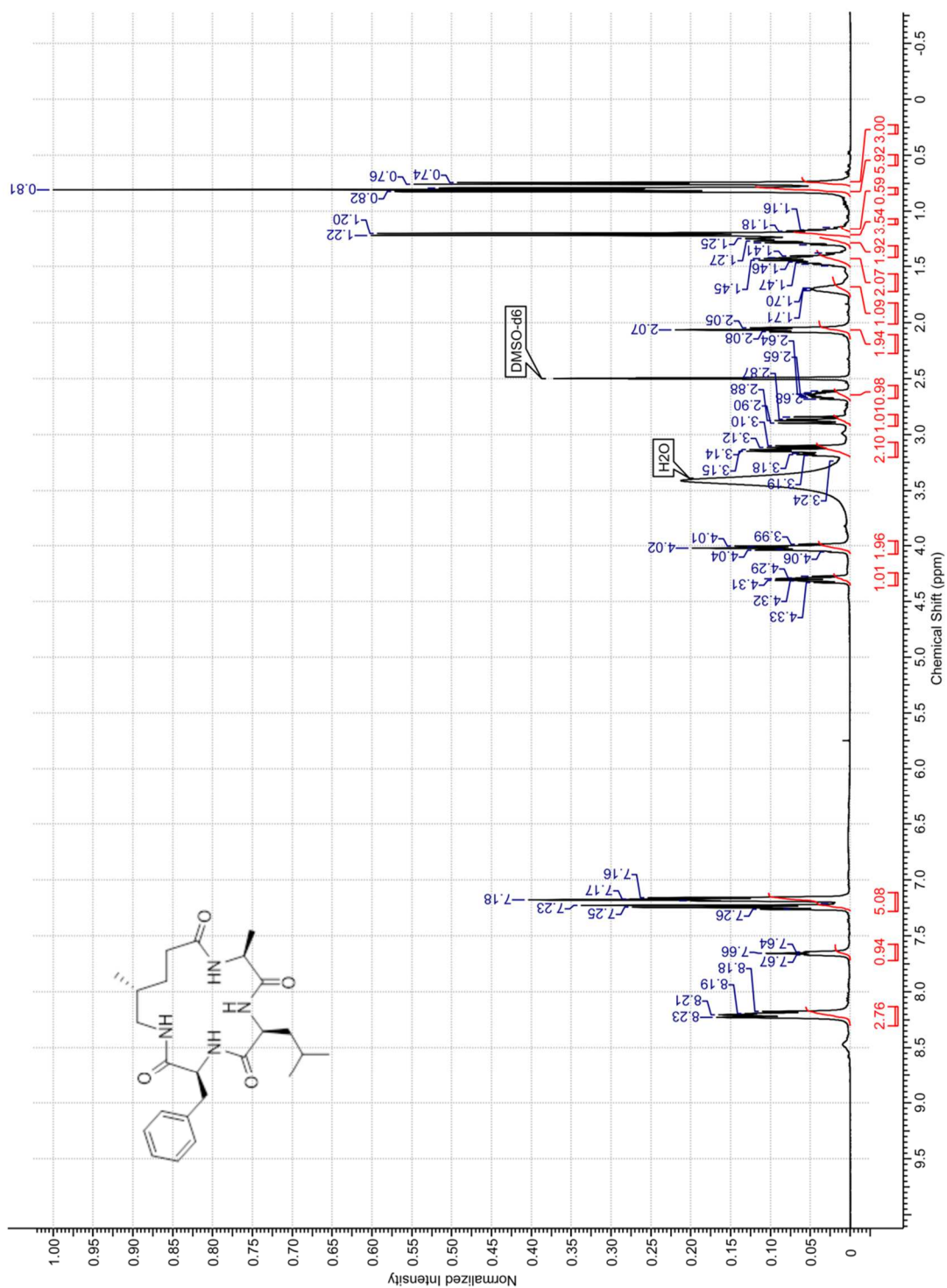


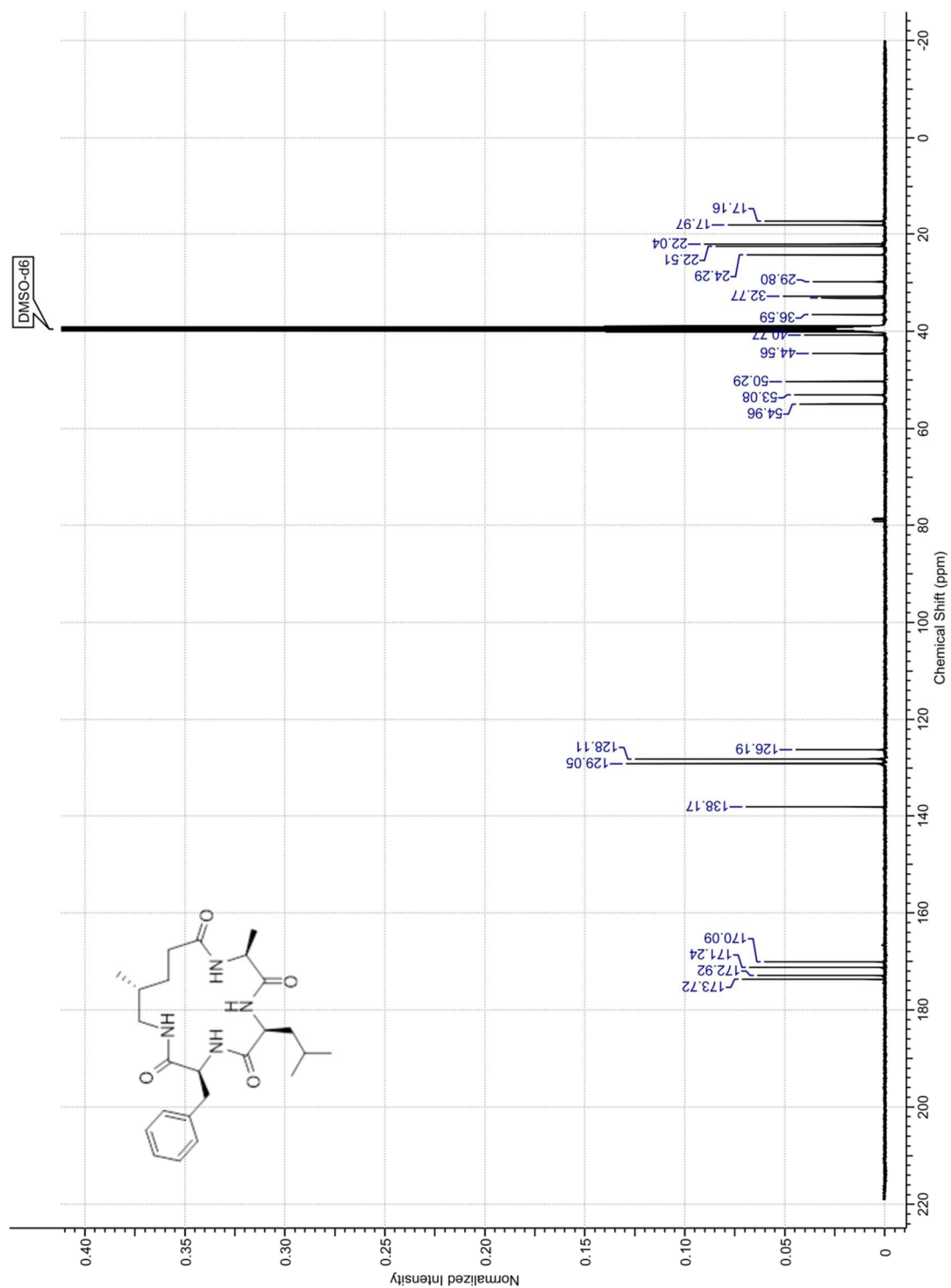
(3*S*,6*S*,13*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-13-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Nala-3*S*) (51)



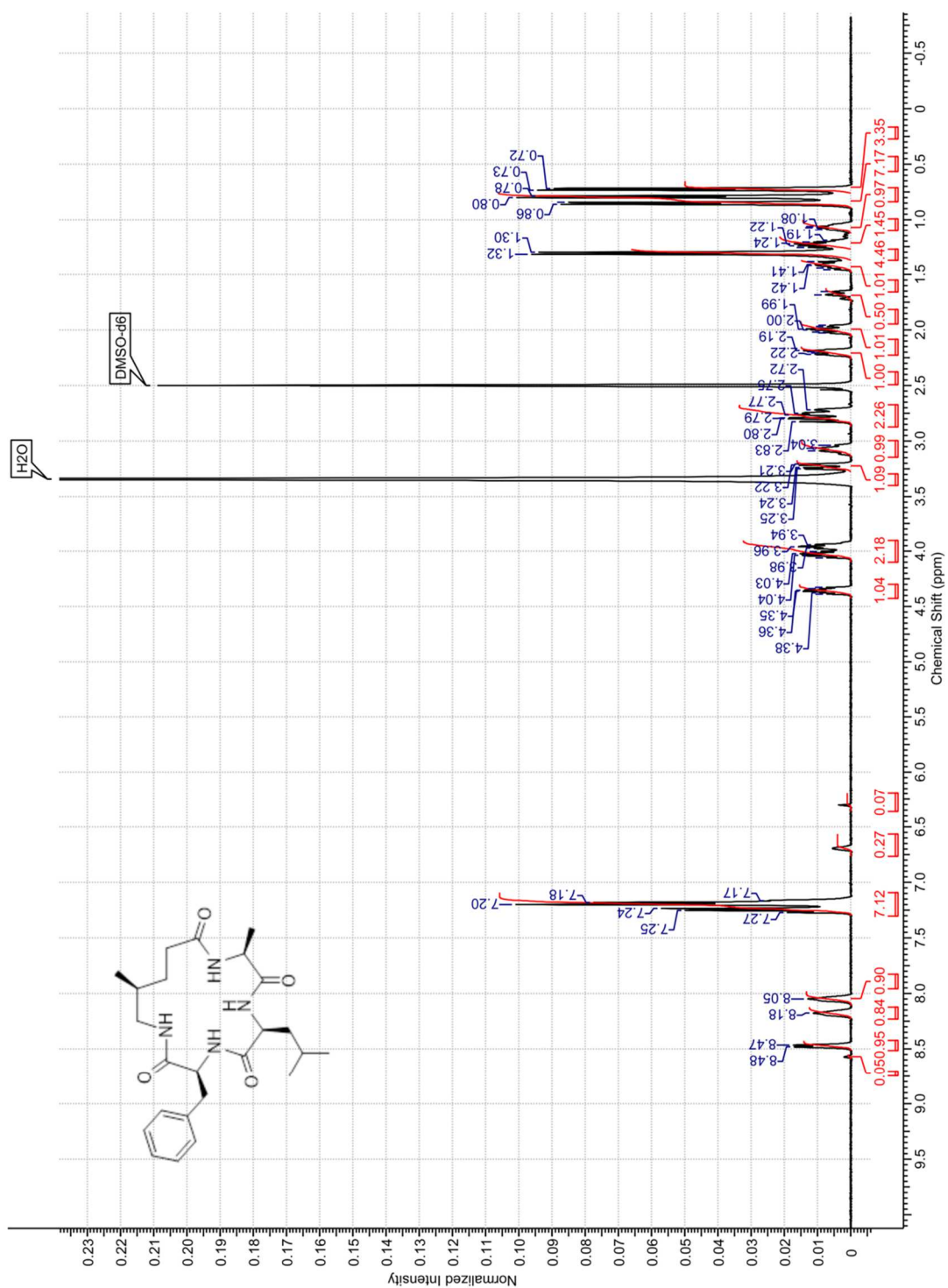


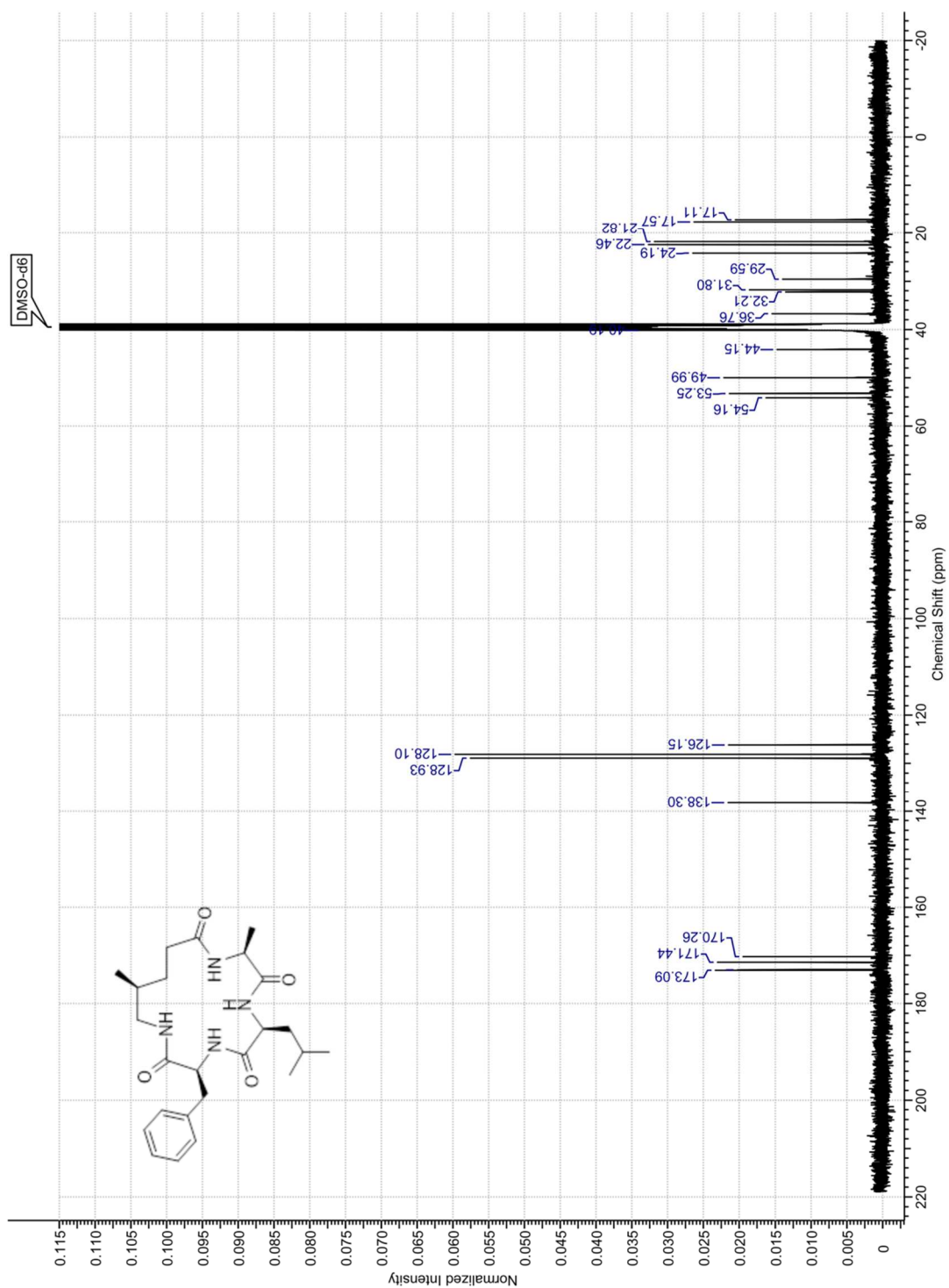
(3*S*,6*S*,9*S*,14*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,14-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Ø-4R) (52)



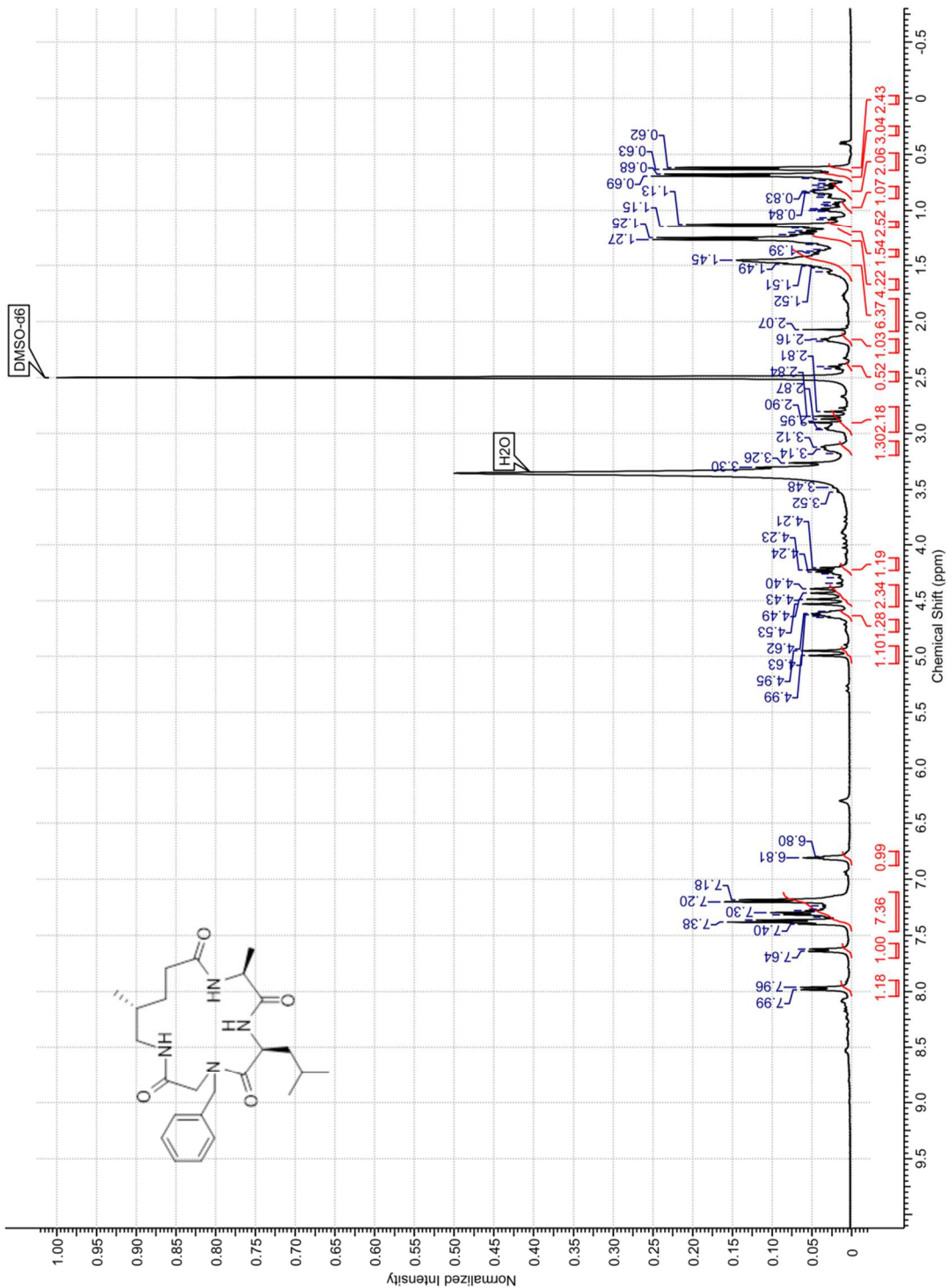


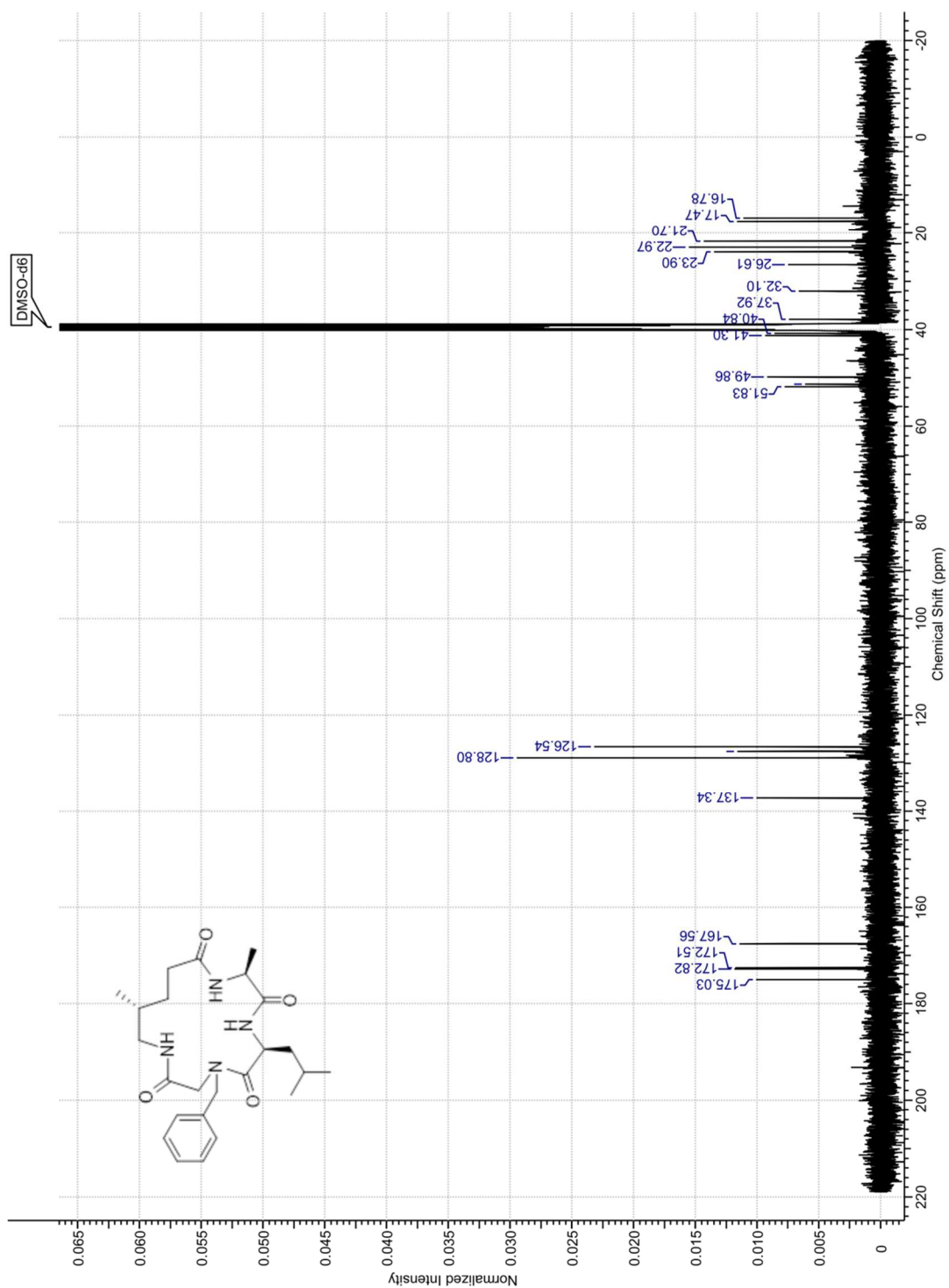
(3*S*,6*S*,9*S*,14*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,14-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Ø-4*S*) (53)



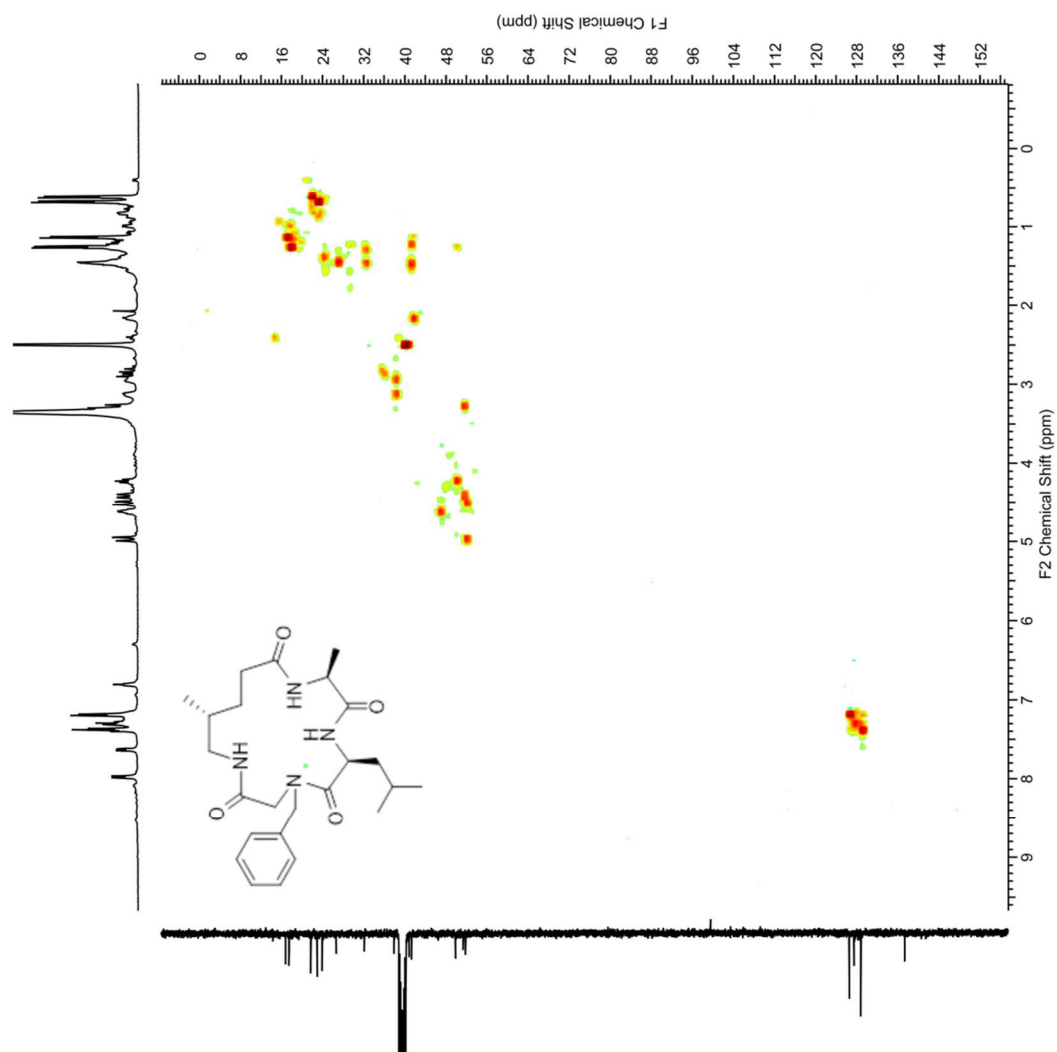


(6*S*,9*S*,14*R*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,14-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Nphe-4R) (54)

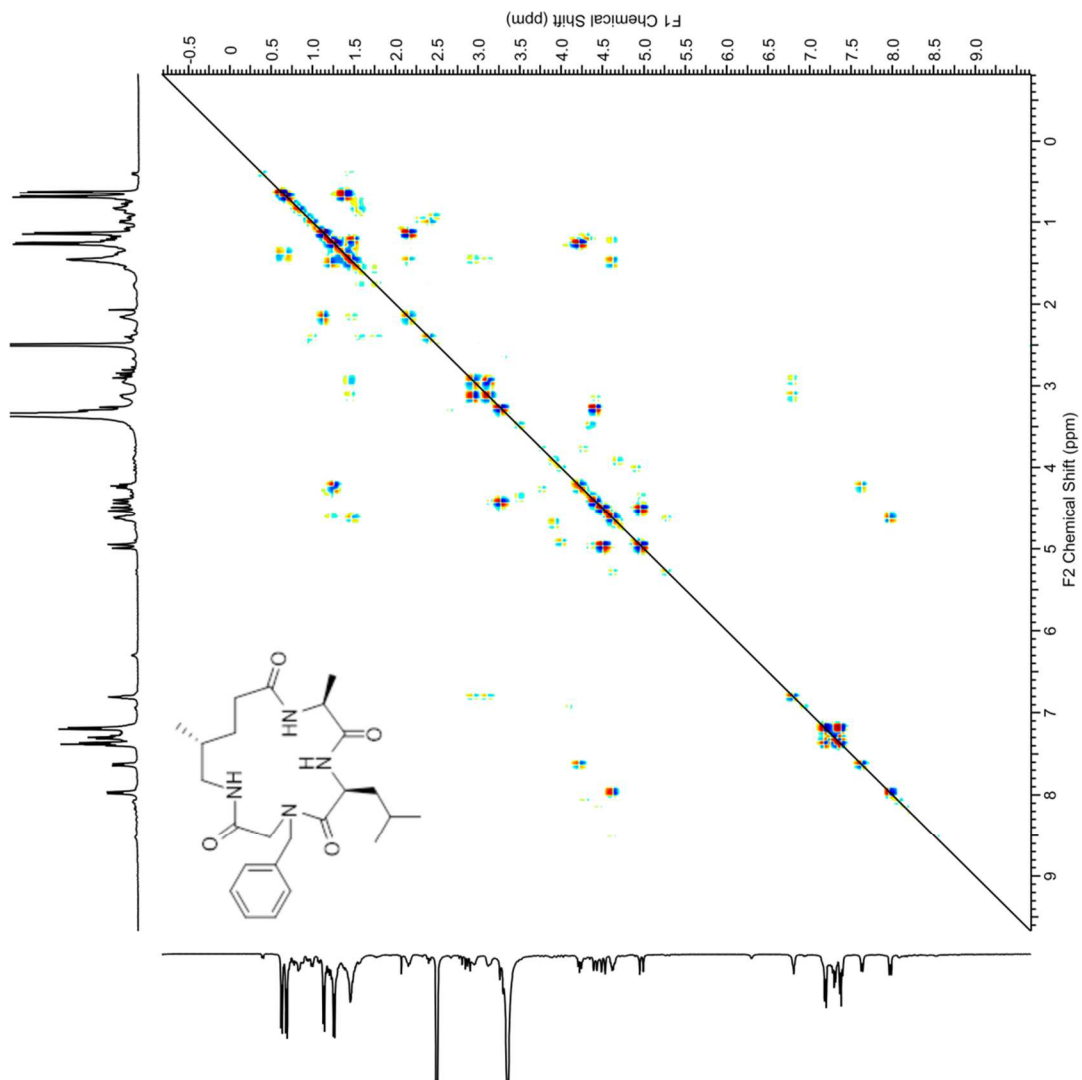




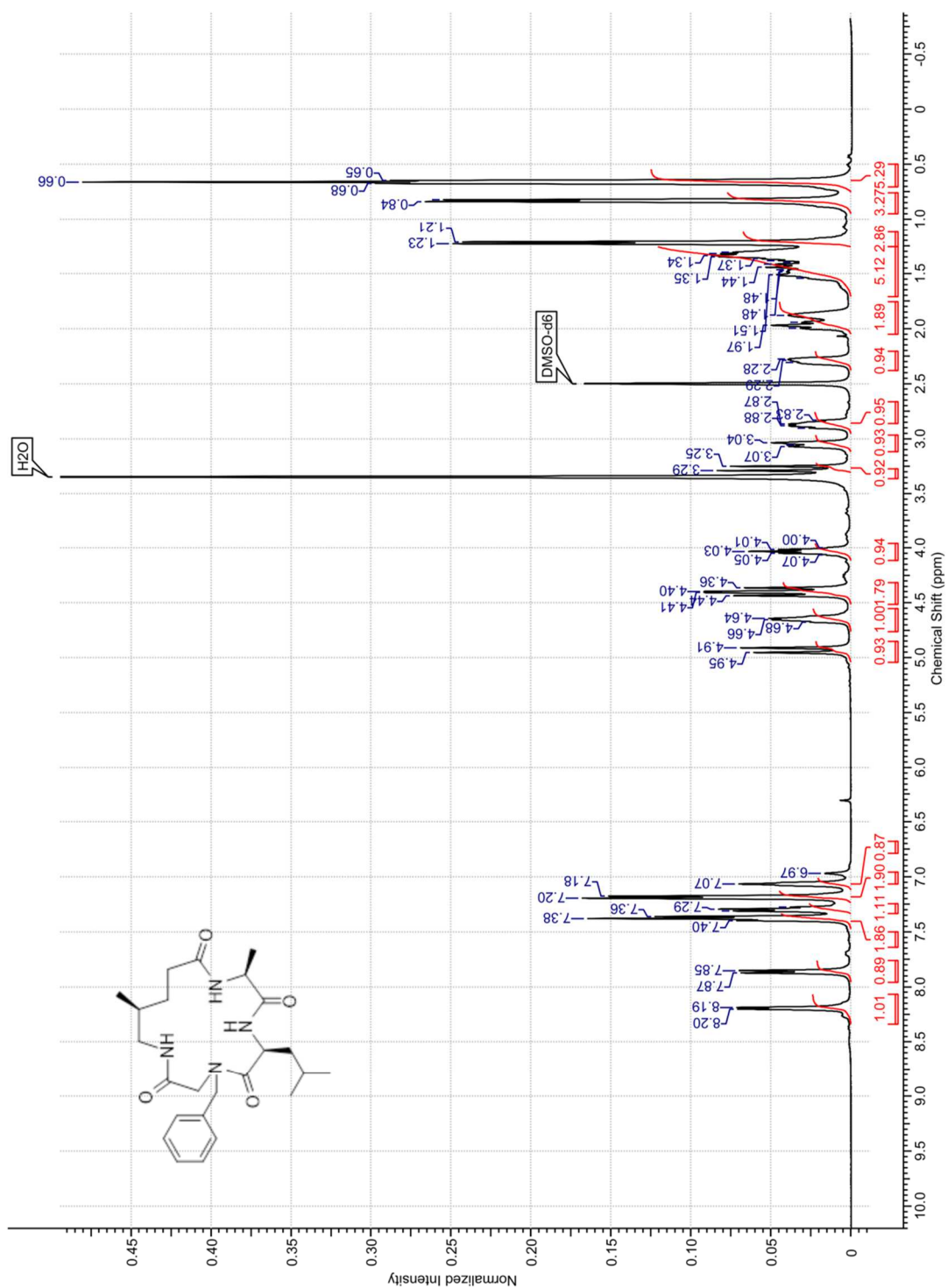
HSQC



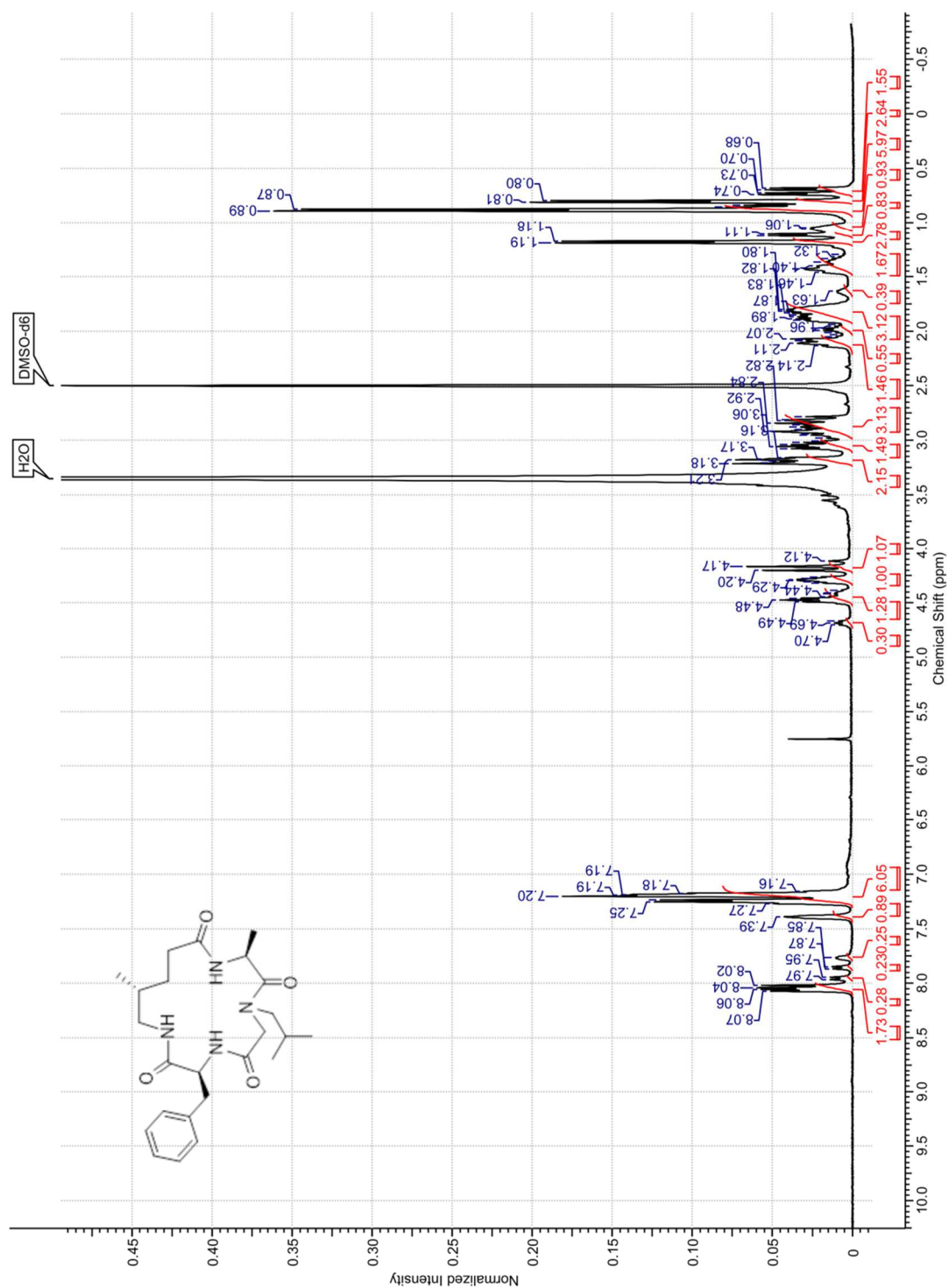
COSY

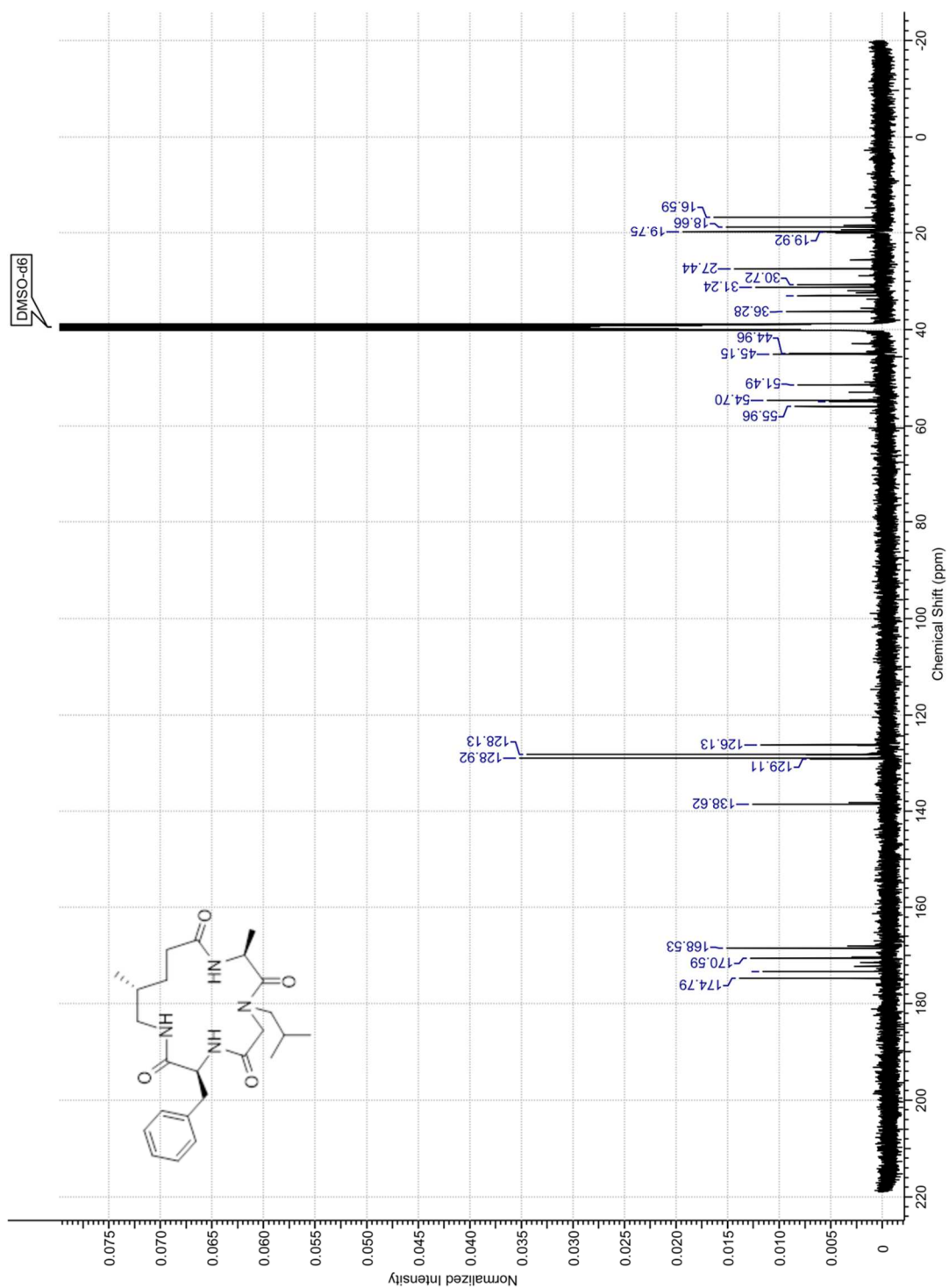


(6*S*,9*S*,14*S*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,14-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Nphe-4*S*) (55)

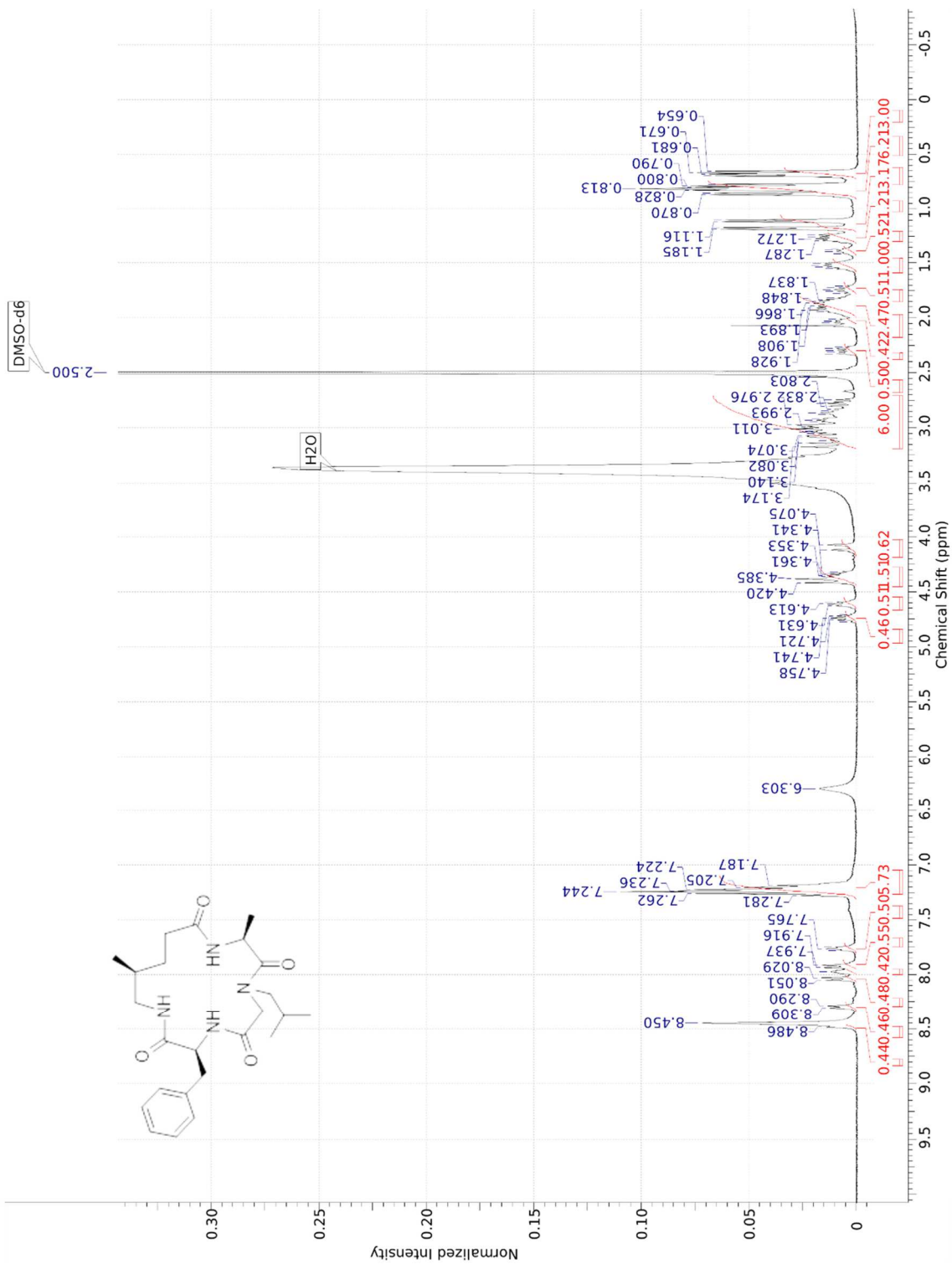


(3*S*,9*S*,14*R*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,14-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nleu-4R) (56)

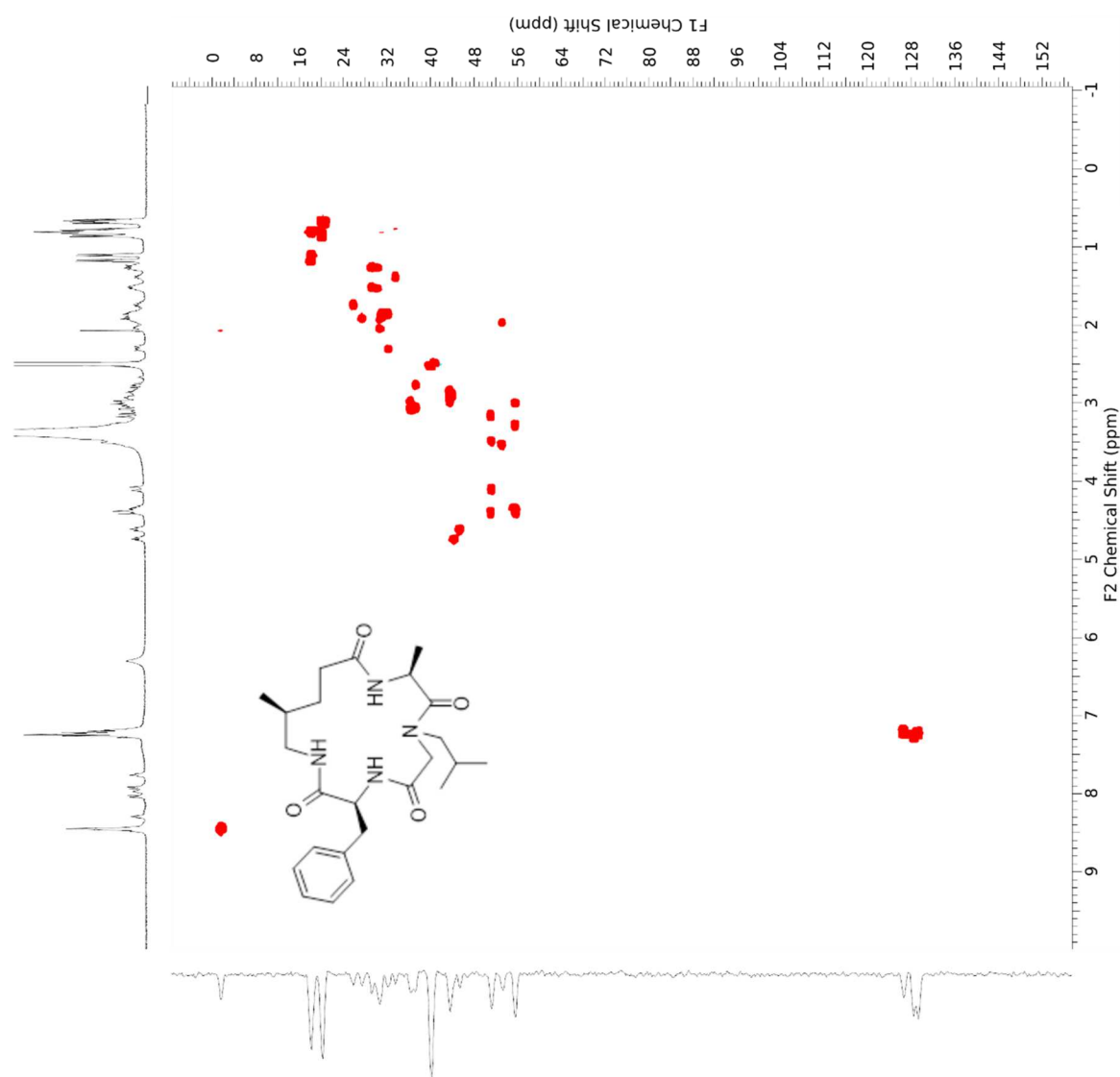




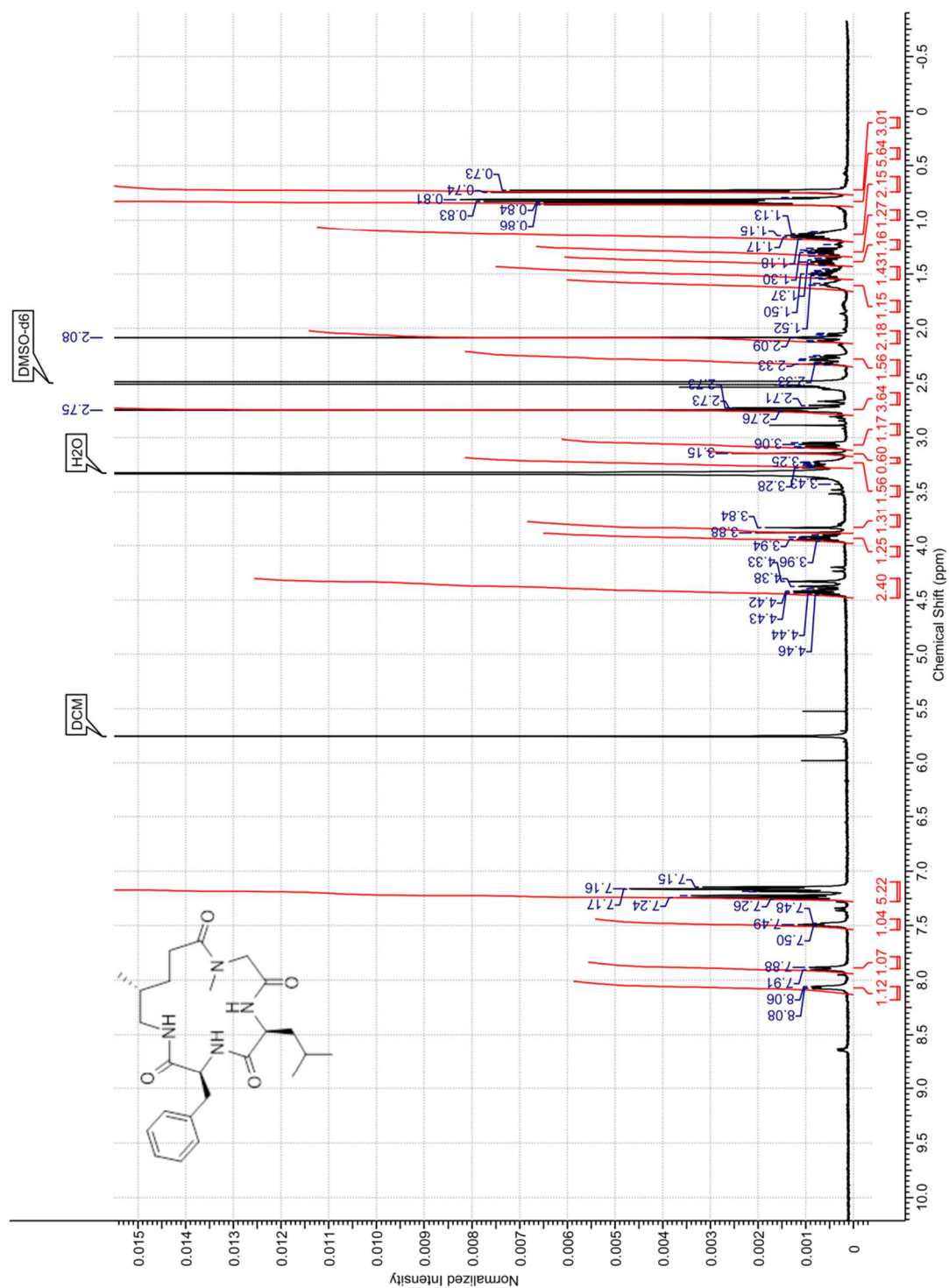
(3*S*,9*S*,14*S*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,14-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Nleu-4*S*) (57)



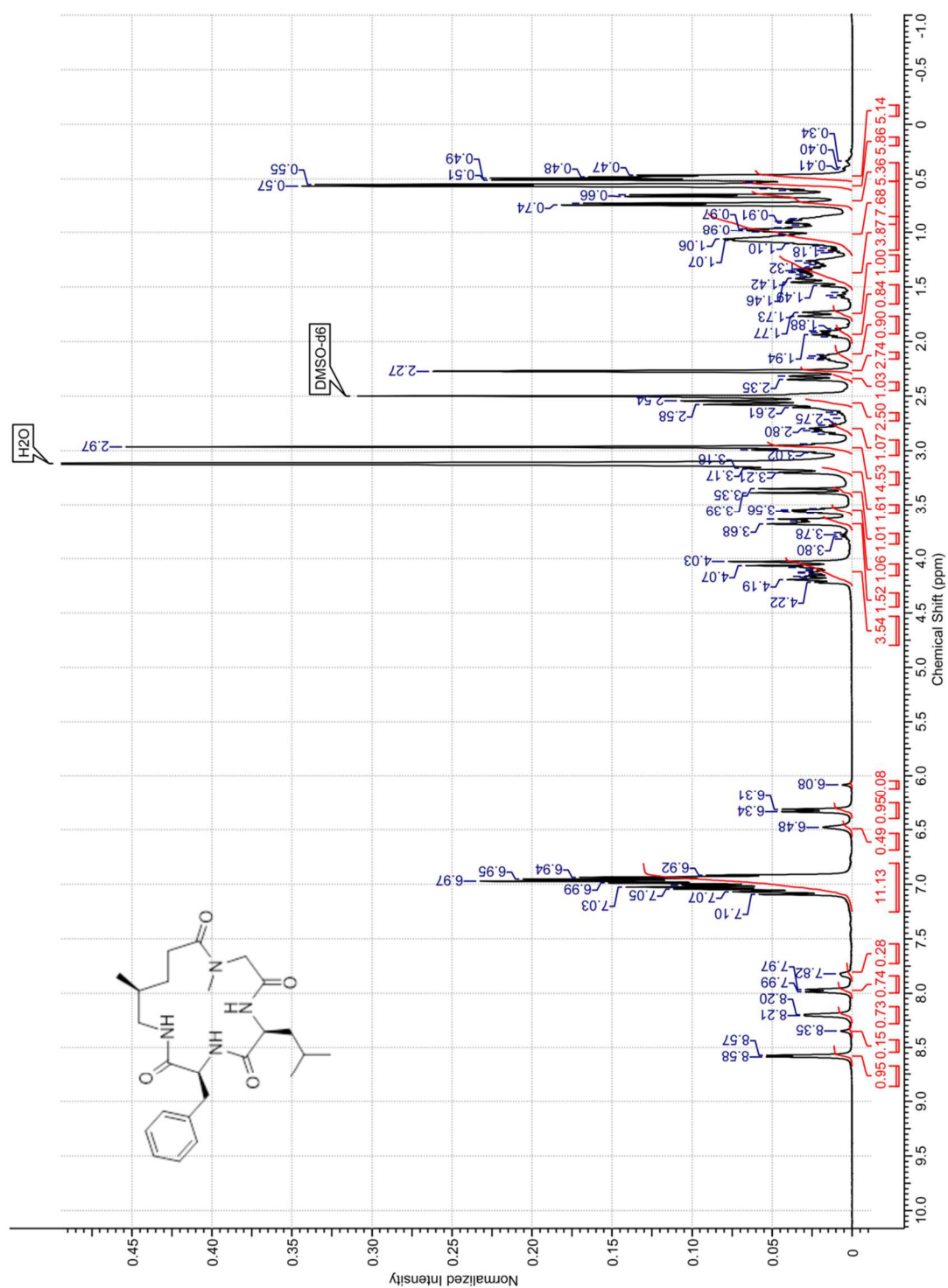
HSQC

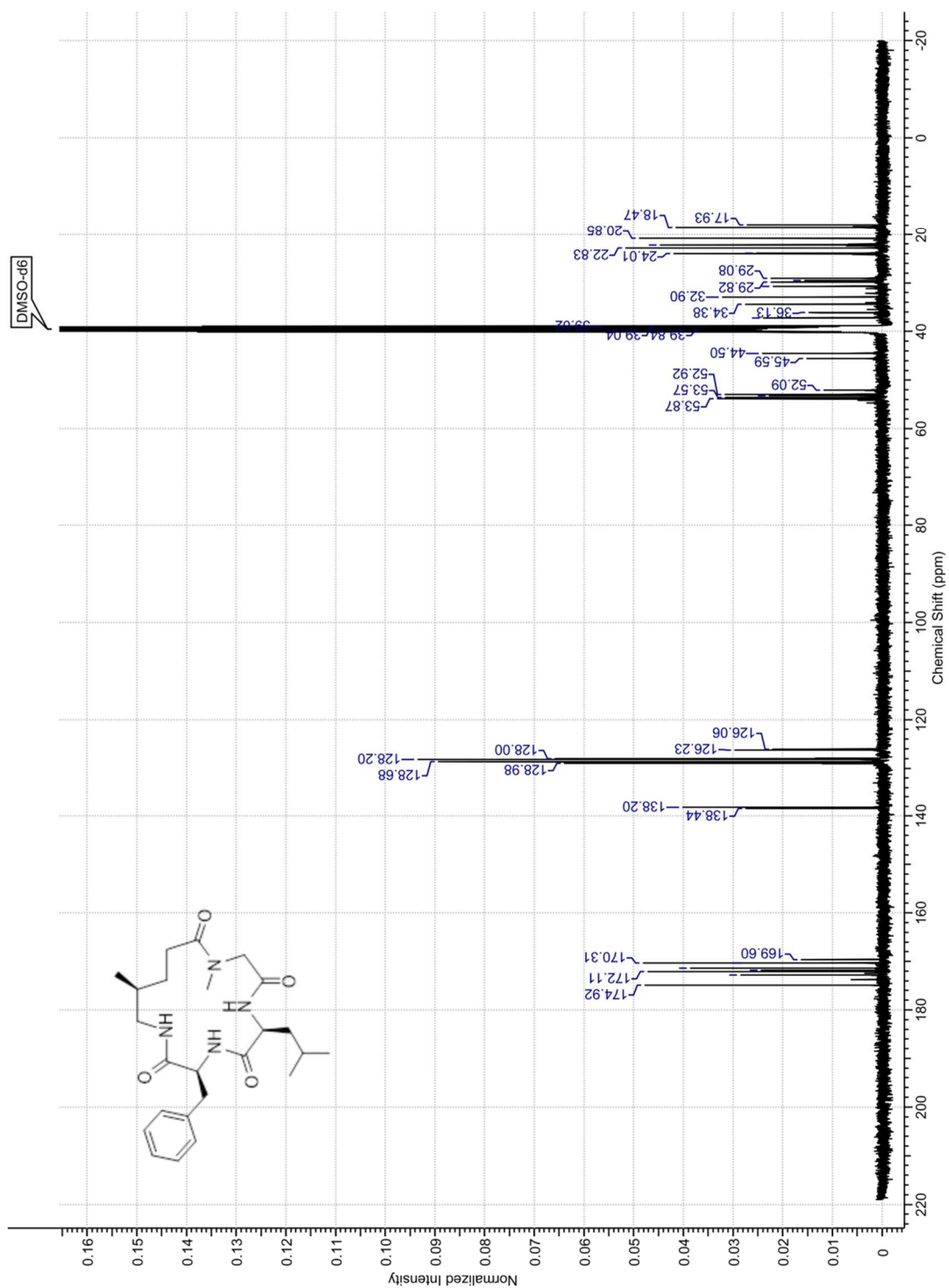


(3*S*,6*S*,14*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-14-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Nala-4*R*) (58)

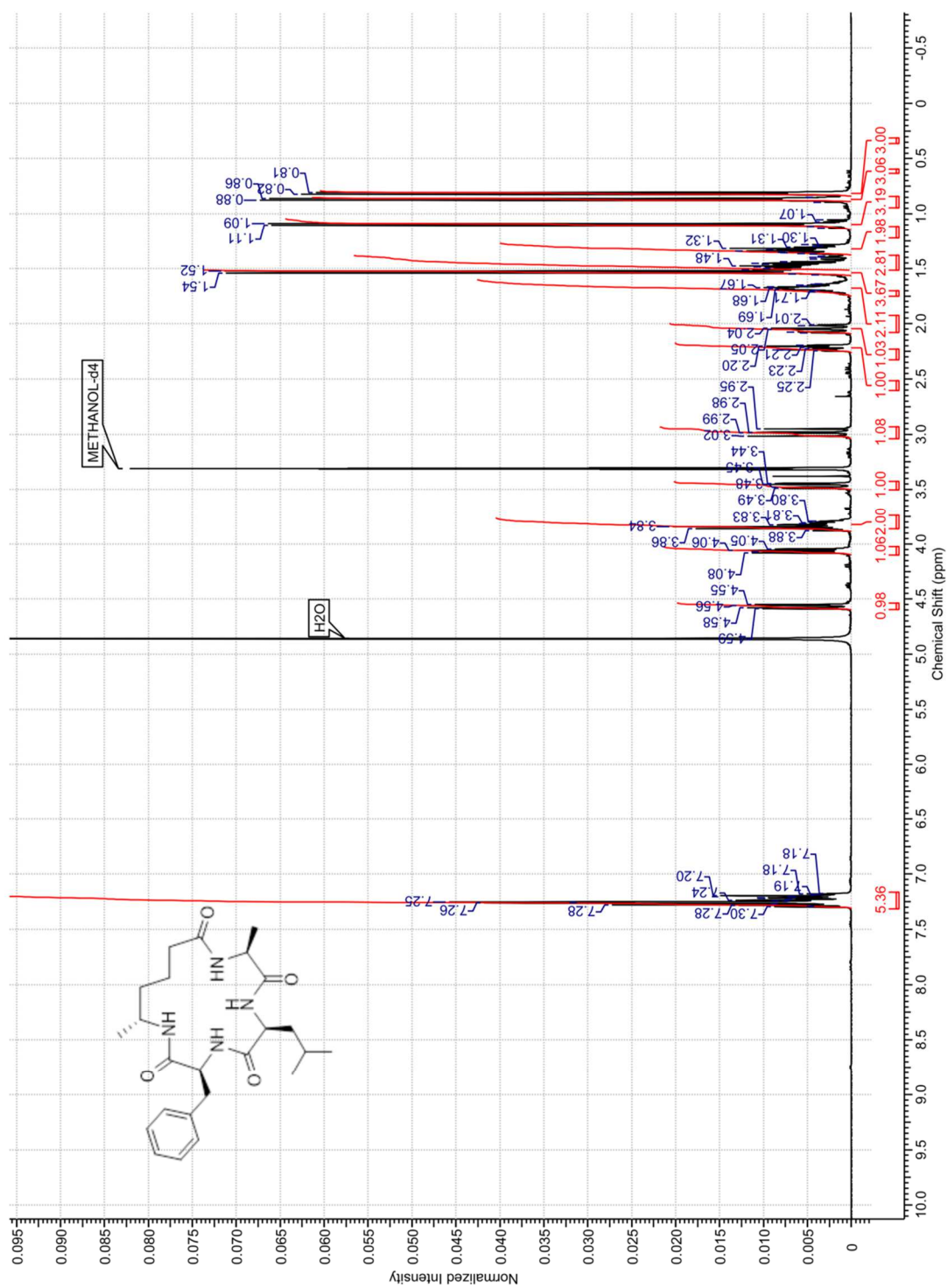


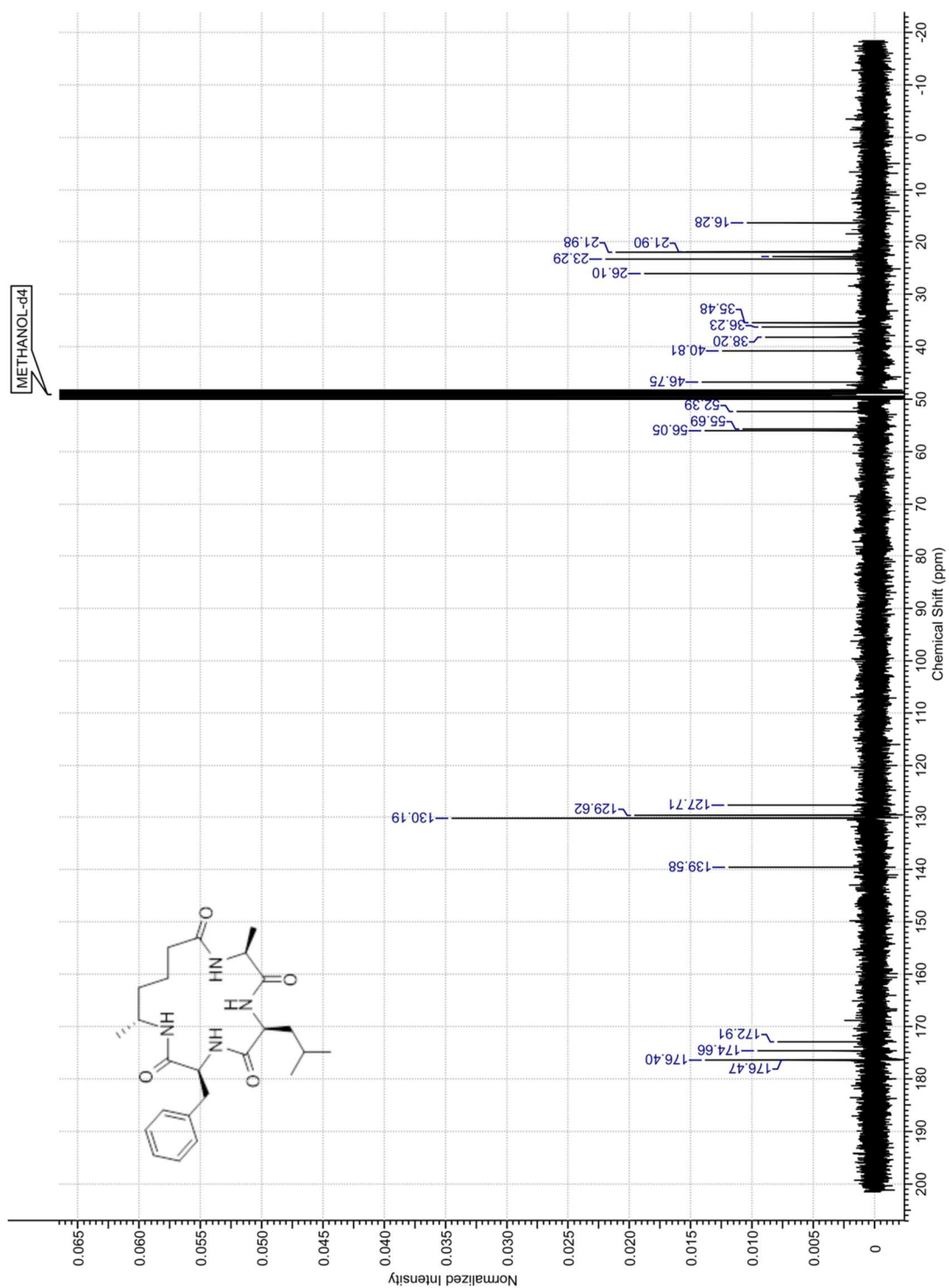
(3S,6S,14S)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-14-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nala-4S) (59)



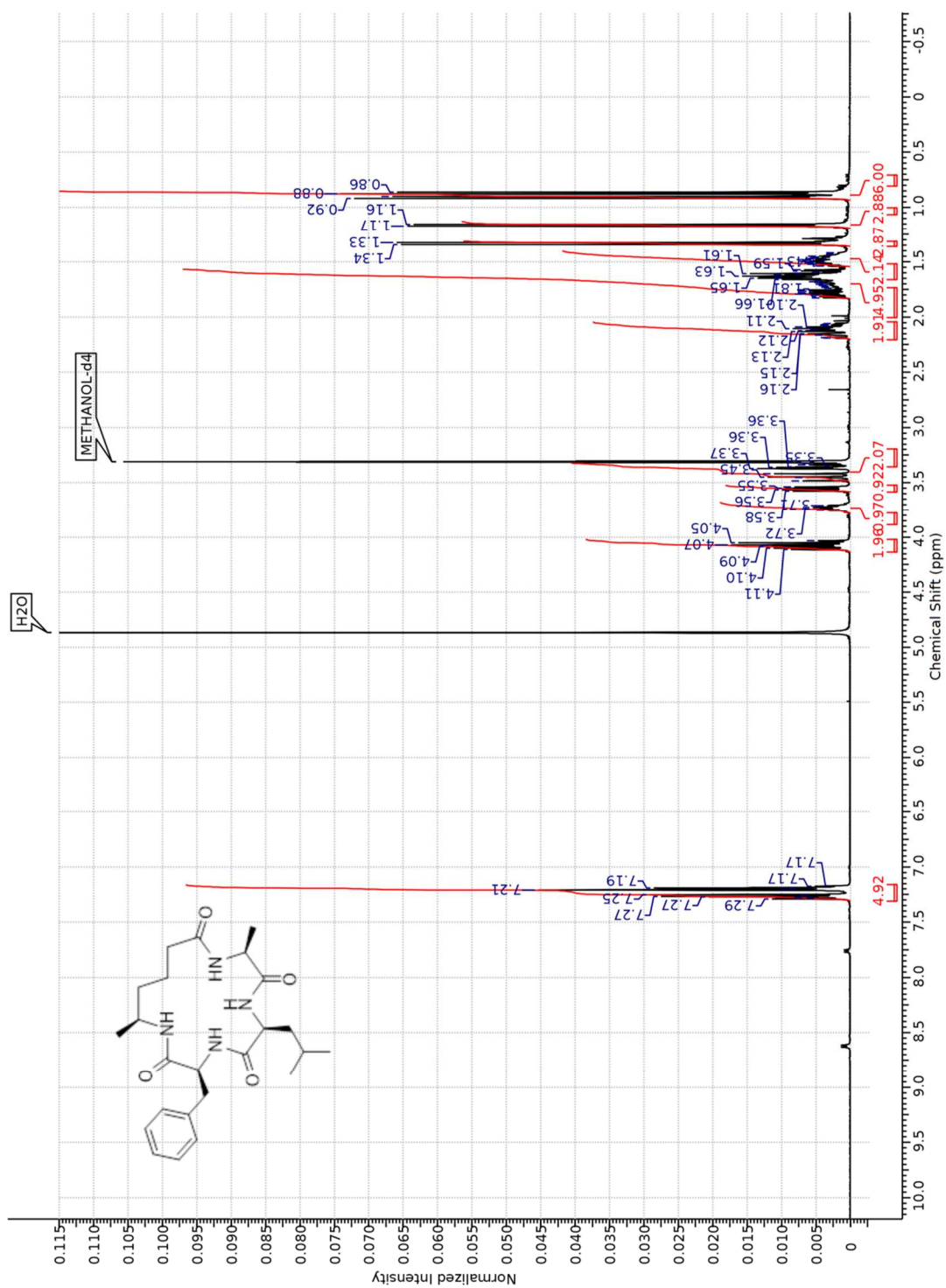


(3*S*,6*S*,9*S*,15*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Ø-5R) (60)

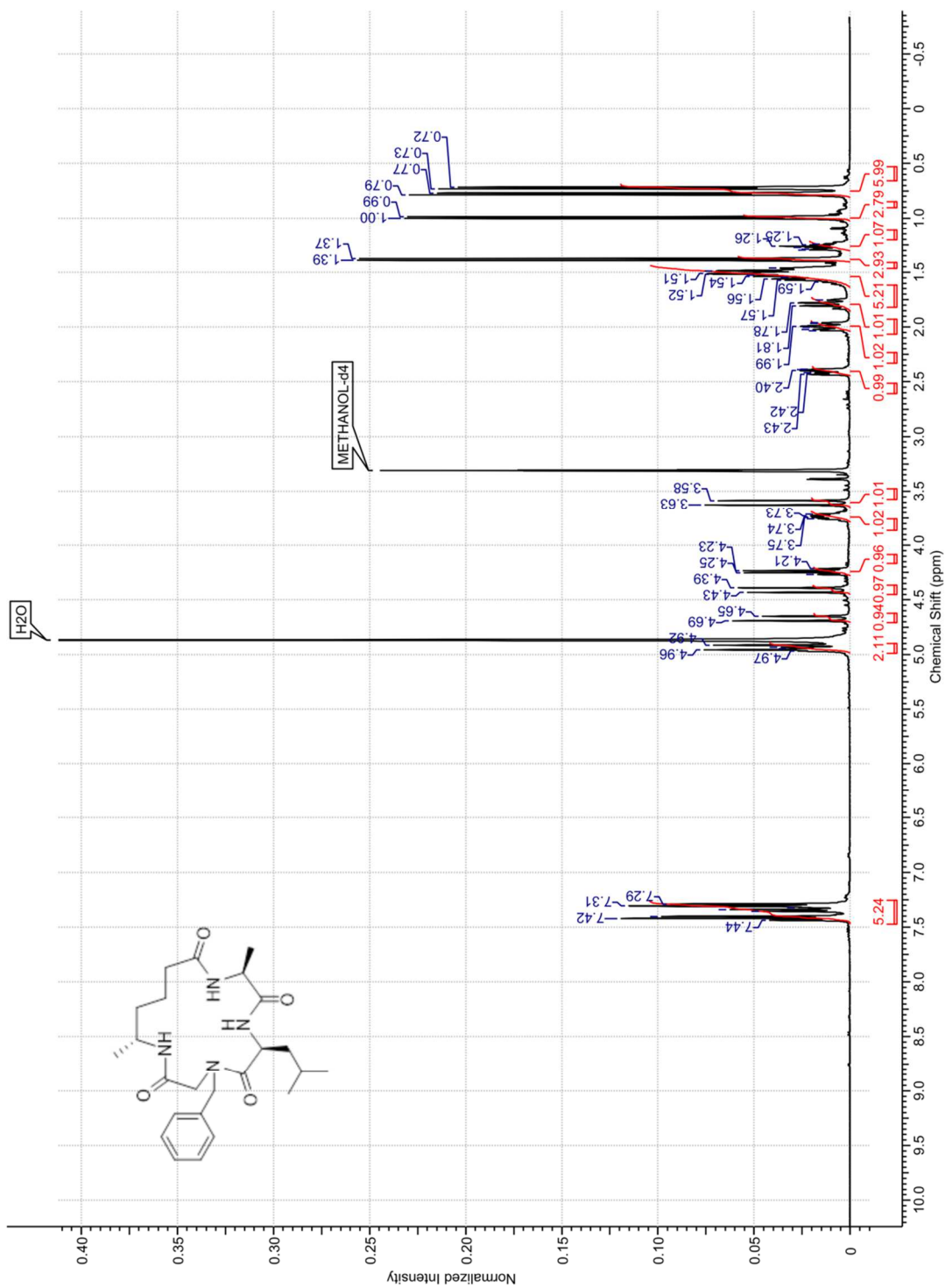


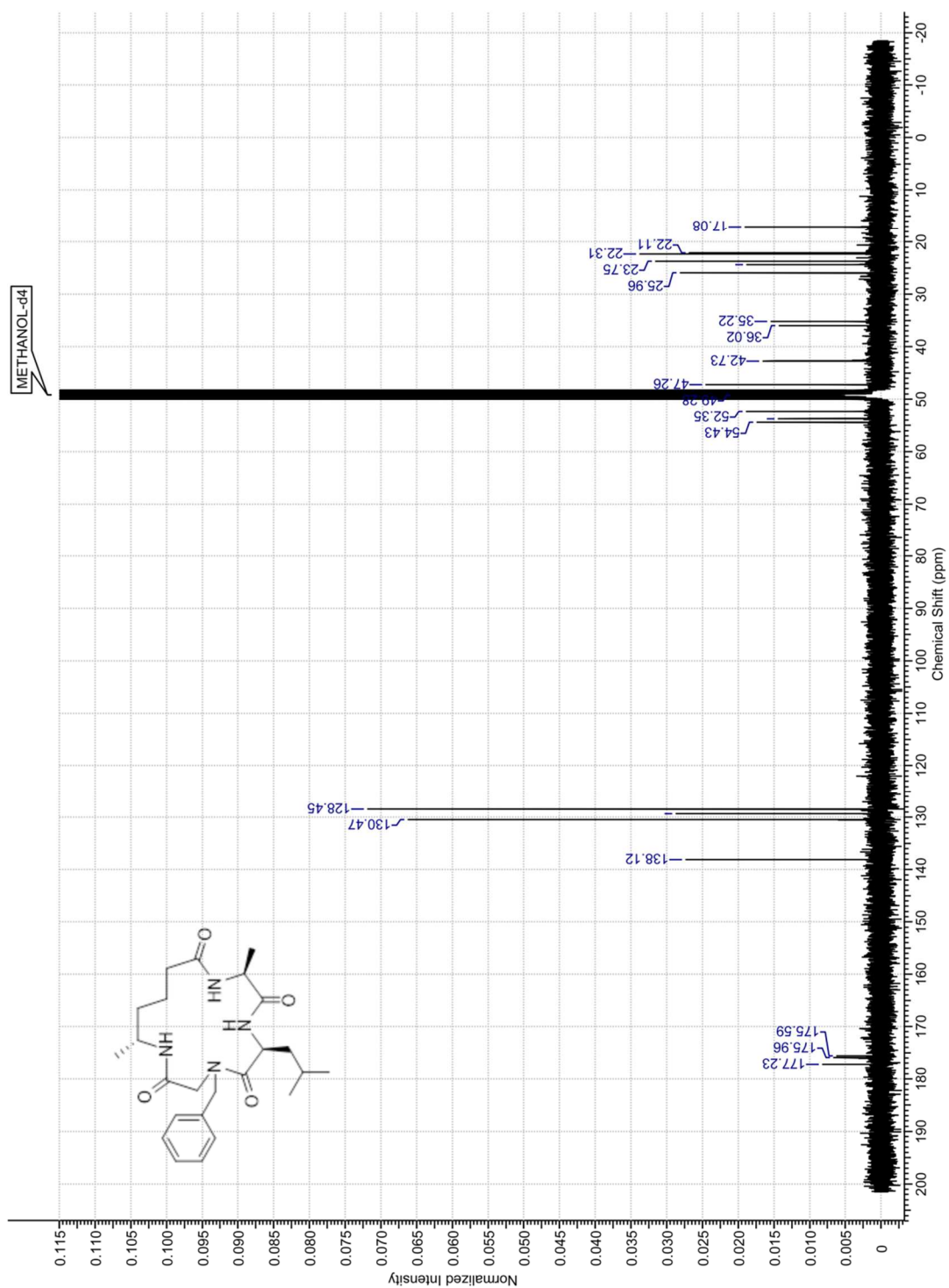


(3S,6S,9S,15S)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Ø-5S) (61)

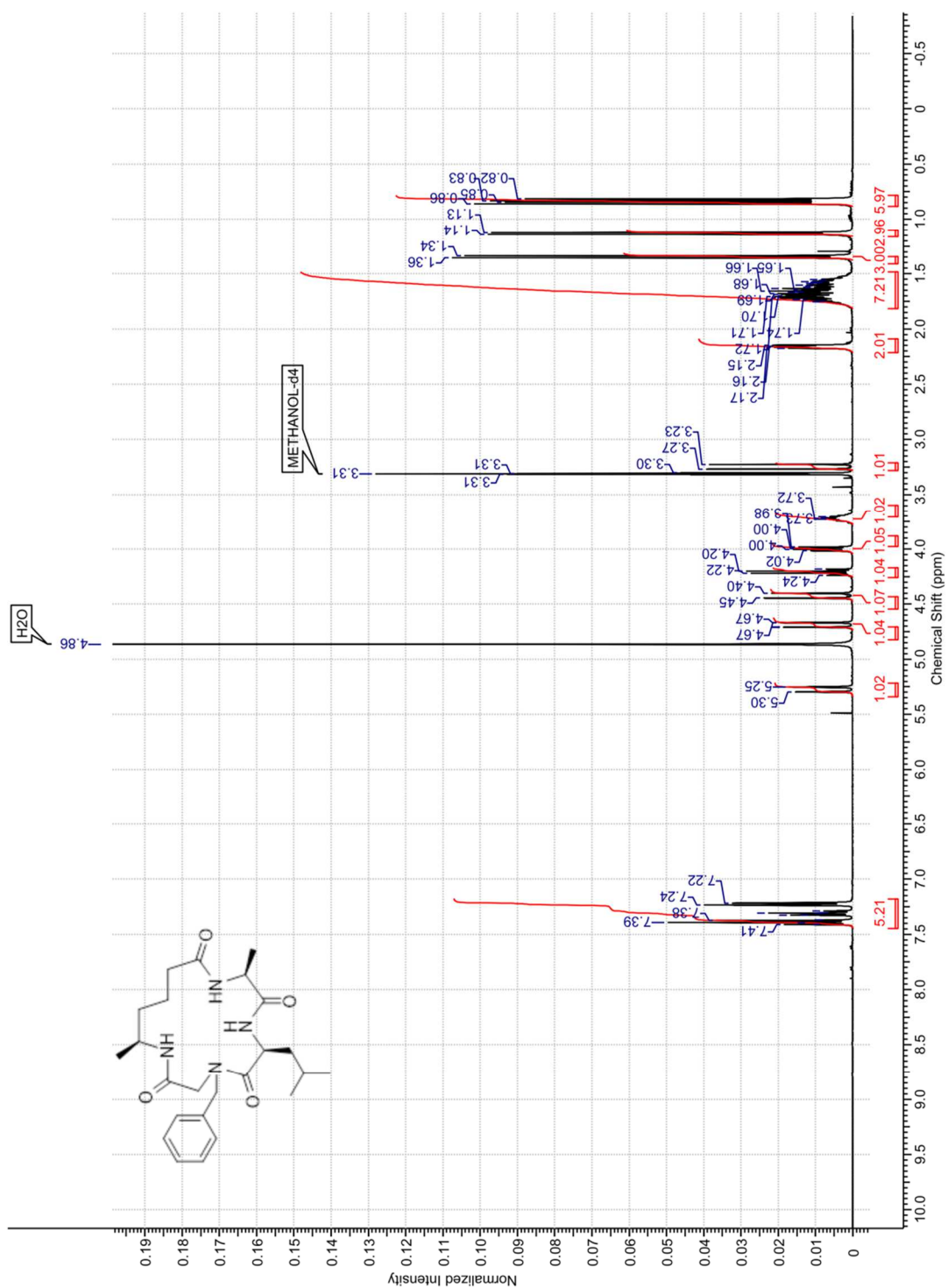


(6*S*,9*S*,15*R*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Nphe-5R) (62)

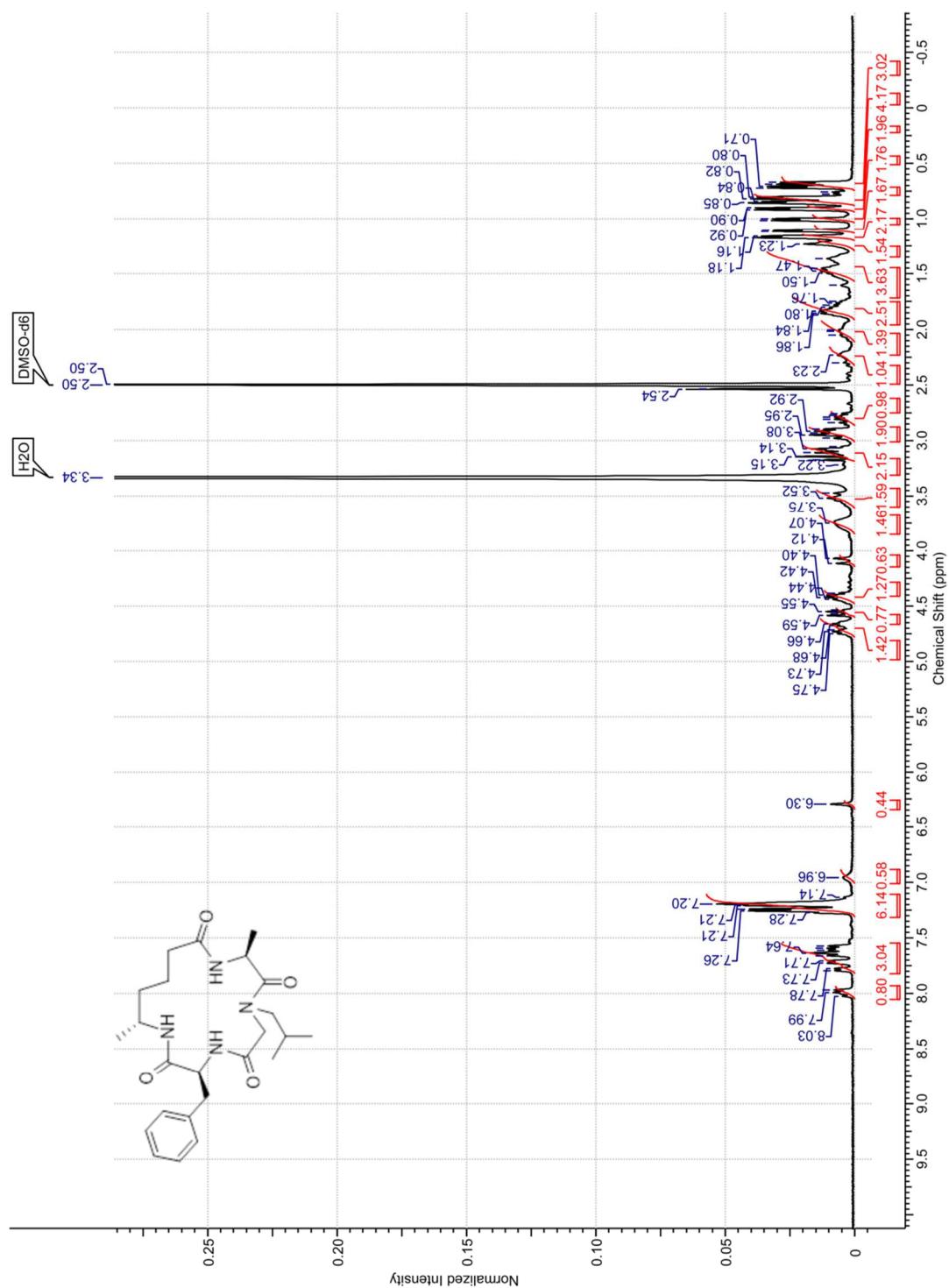


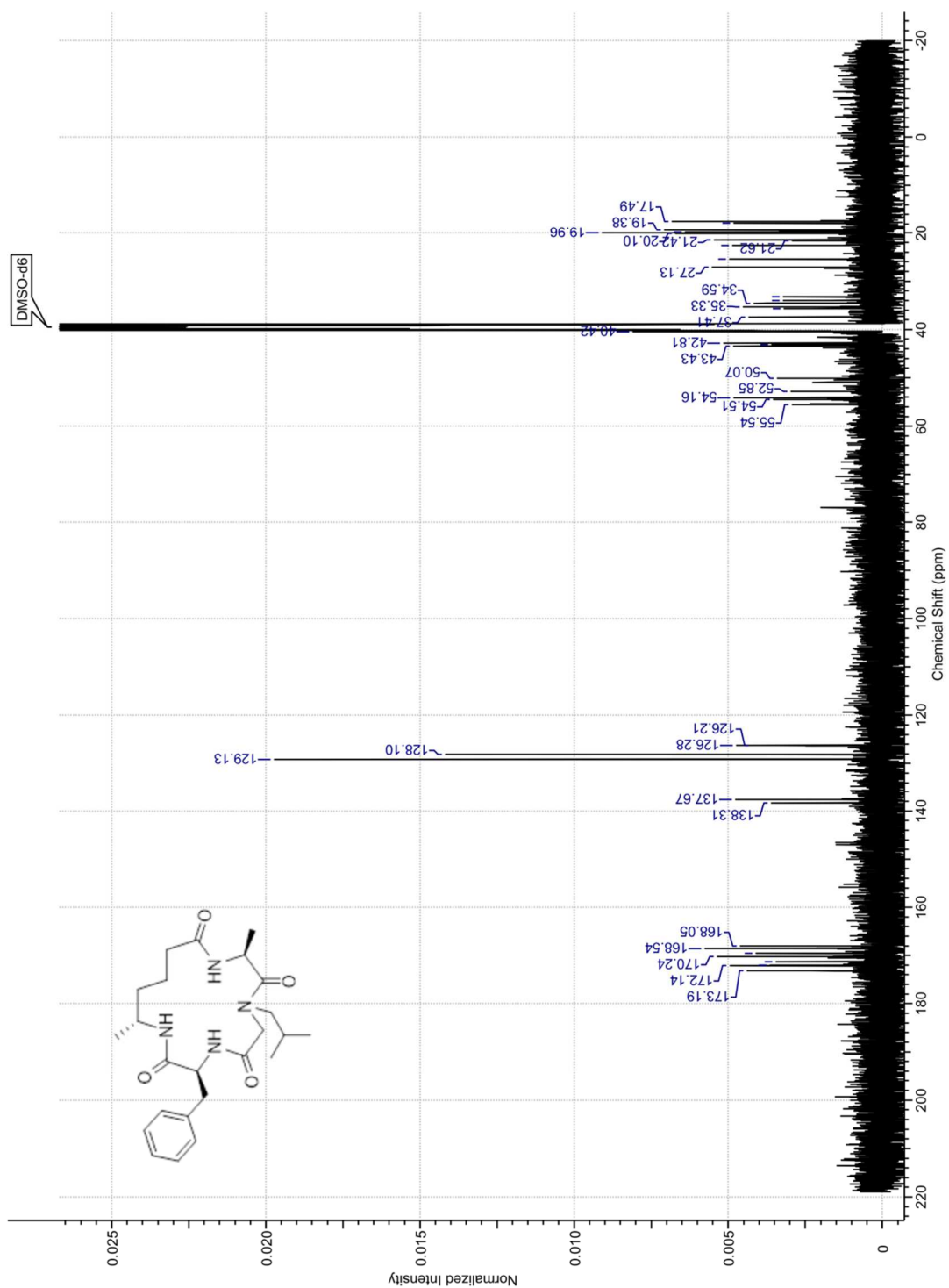


(6*S*,9*S*,15*S*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Nphe-5*S*) (63)

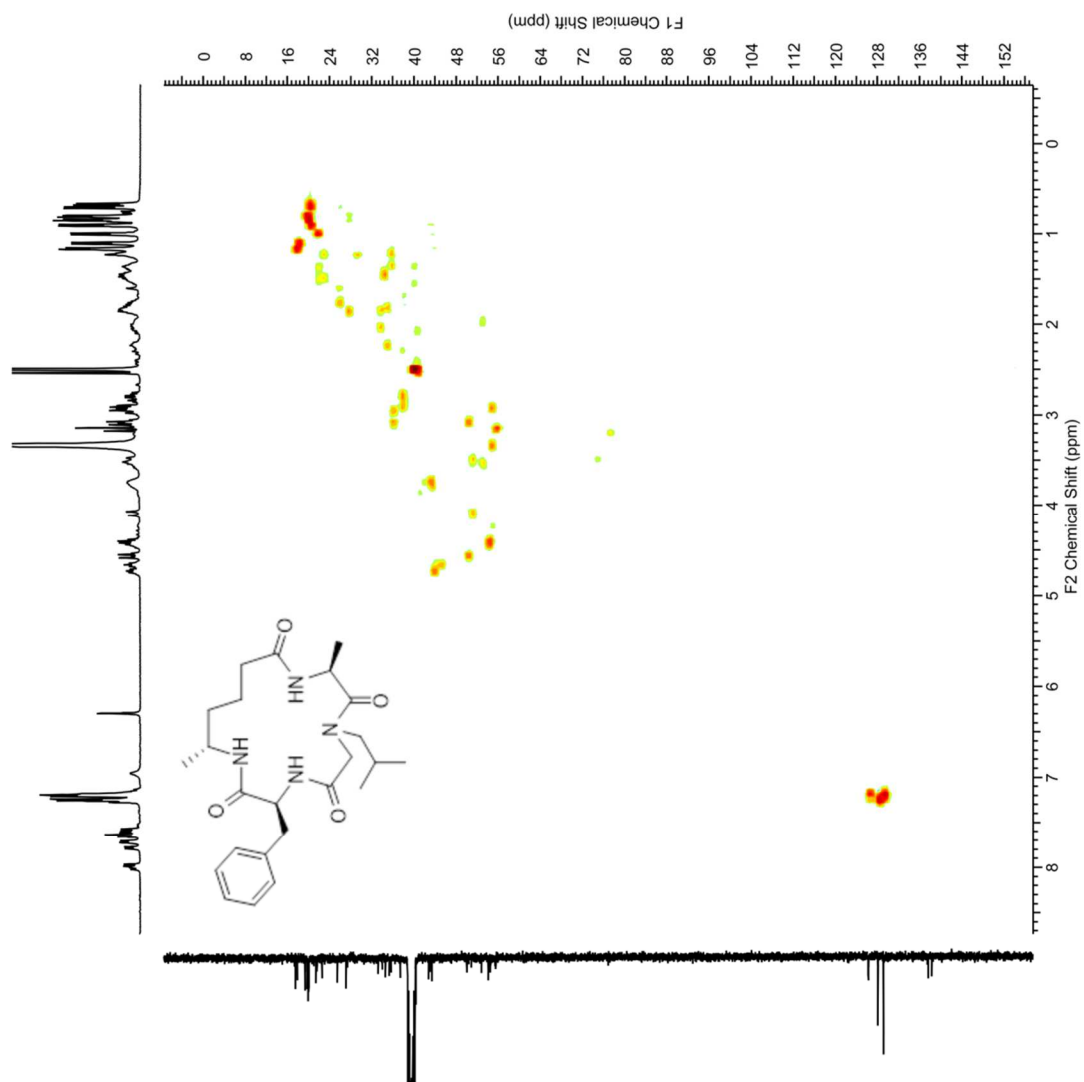


(3*S*,9*S*,15*R*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nleu-5R) (64)

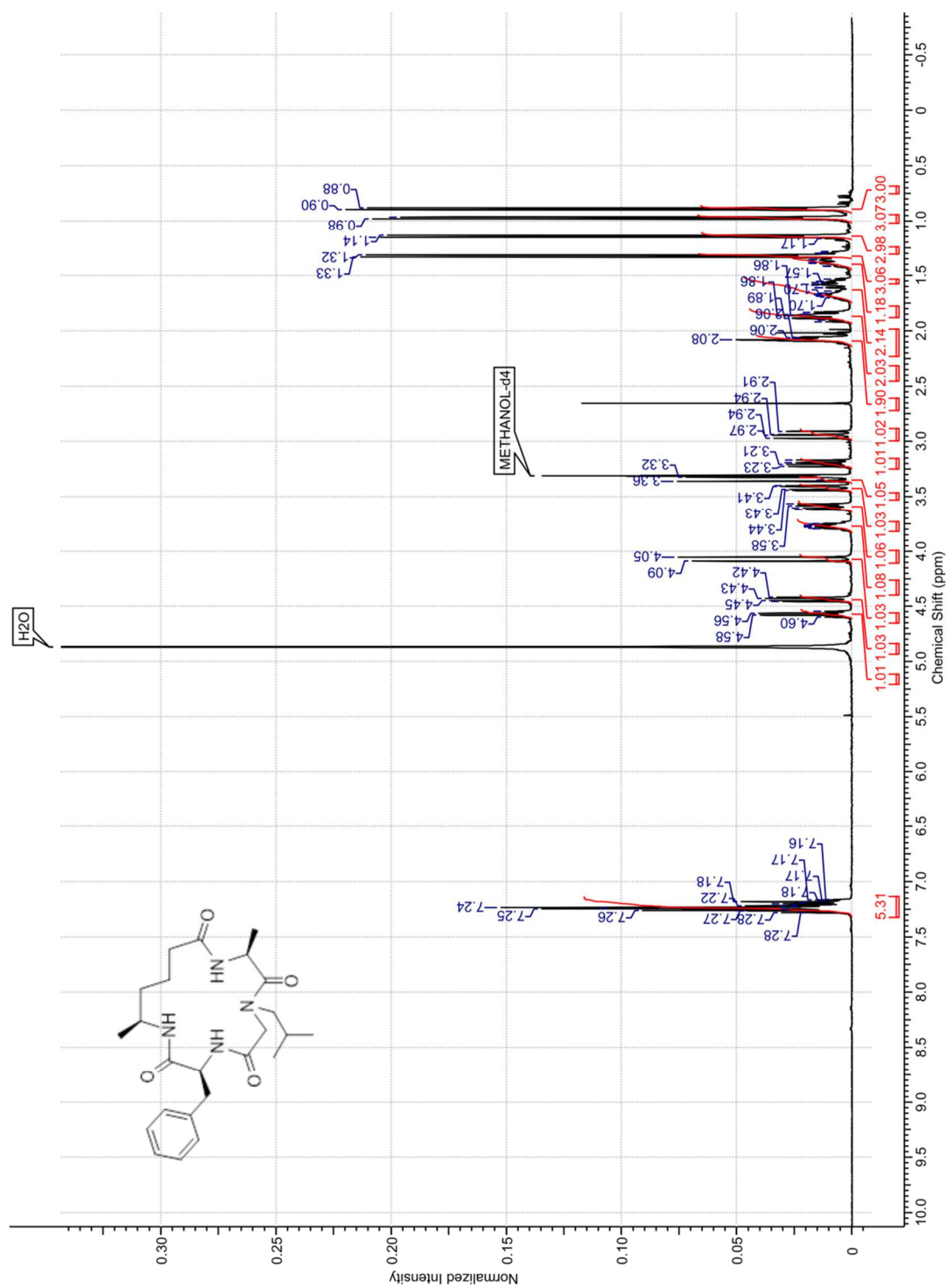




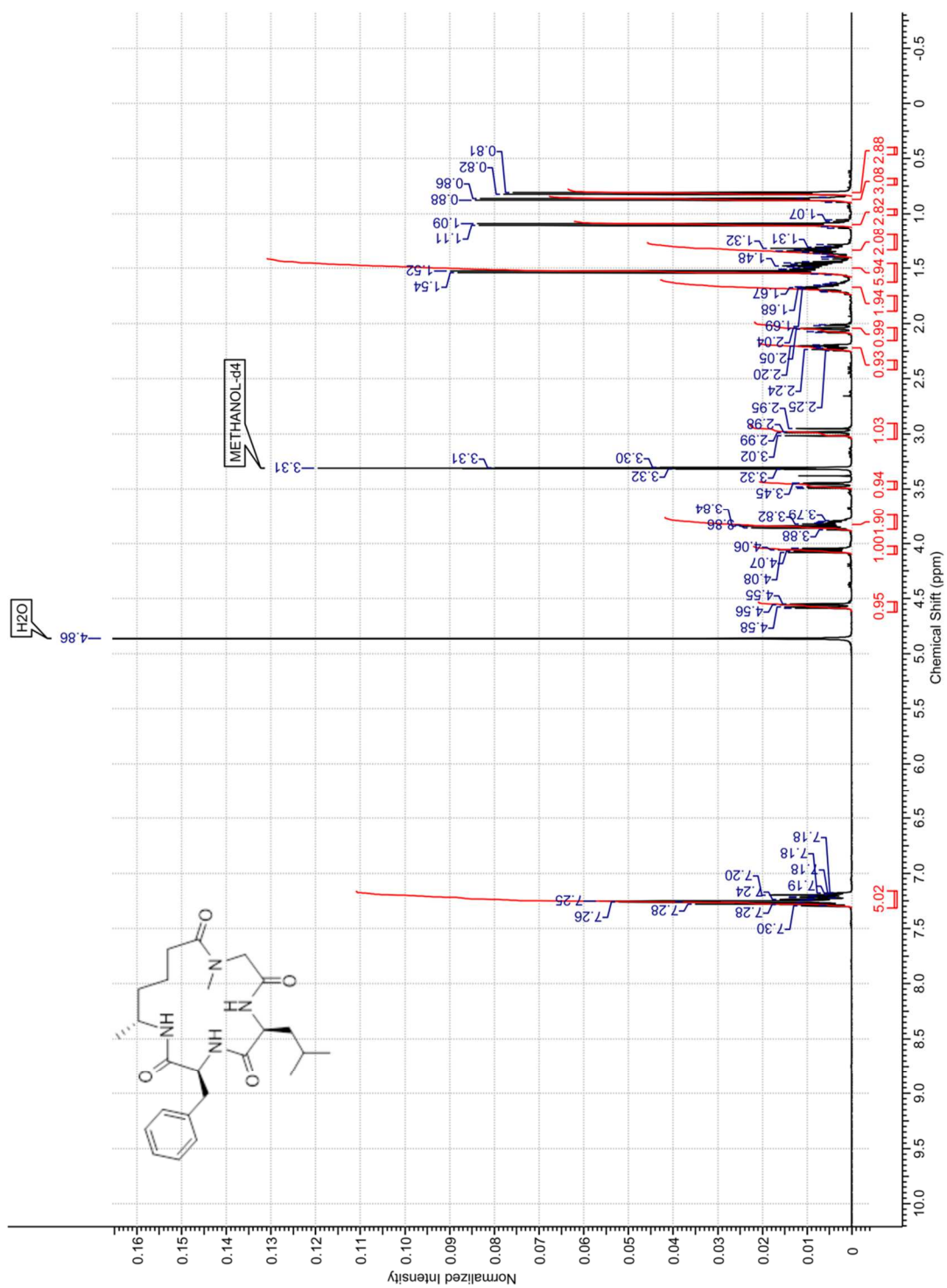
HSQC

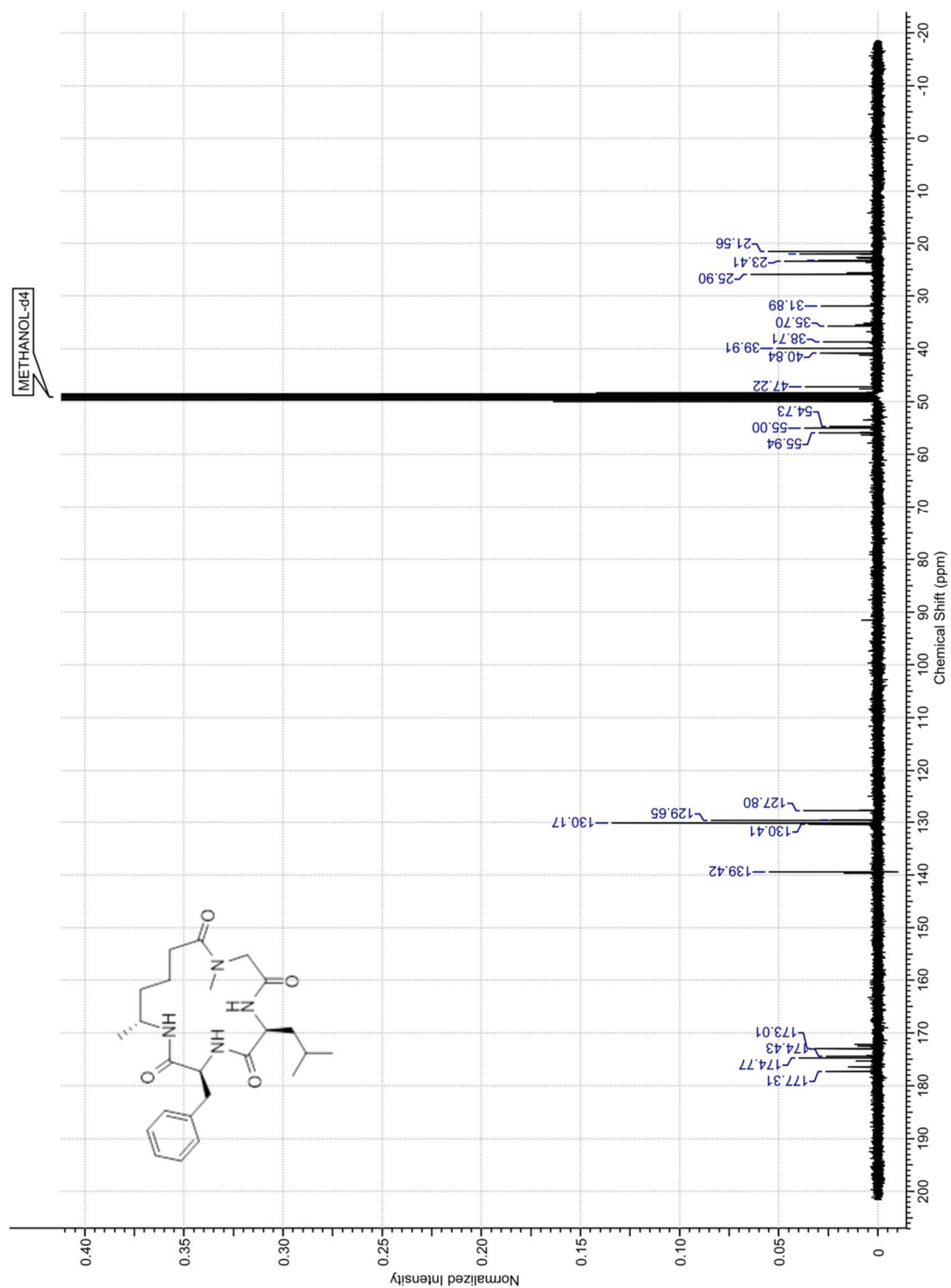


(3*S*,9*S*,15*S*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron (Nleu-5S) (65)

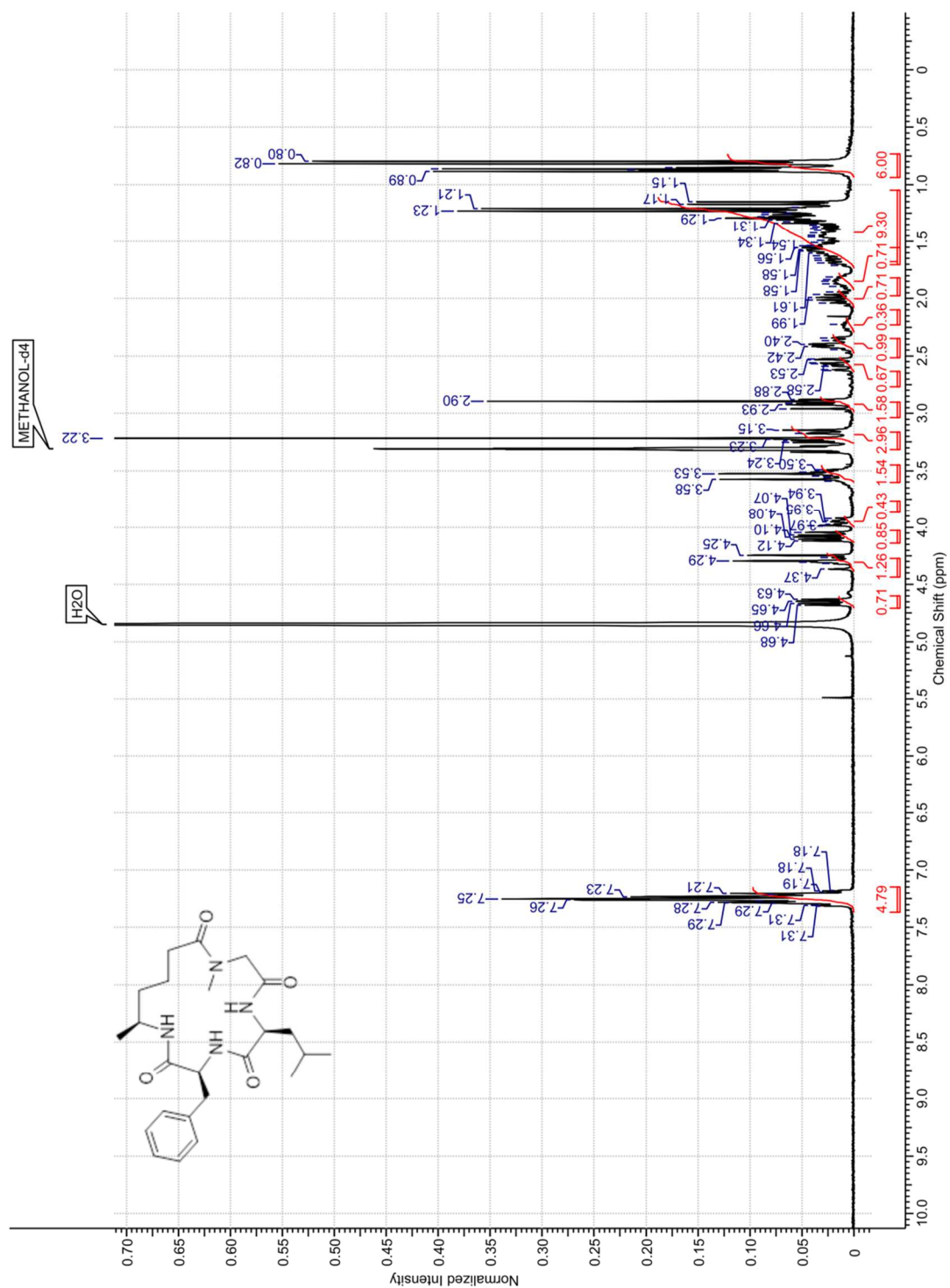


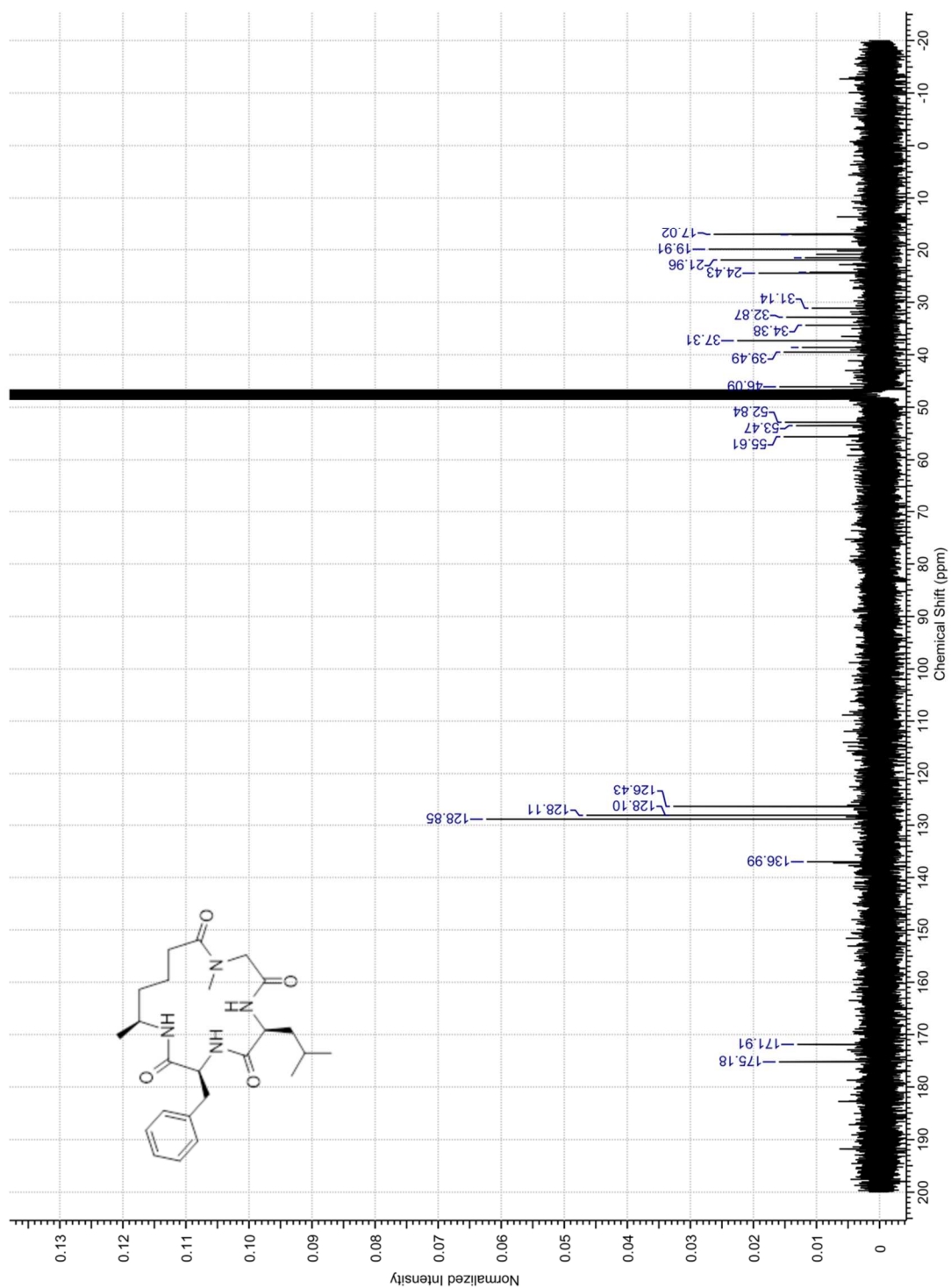
(3*S*,6*S*,15*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-15-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetraone (Nala-5*R*) (66)



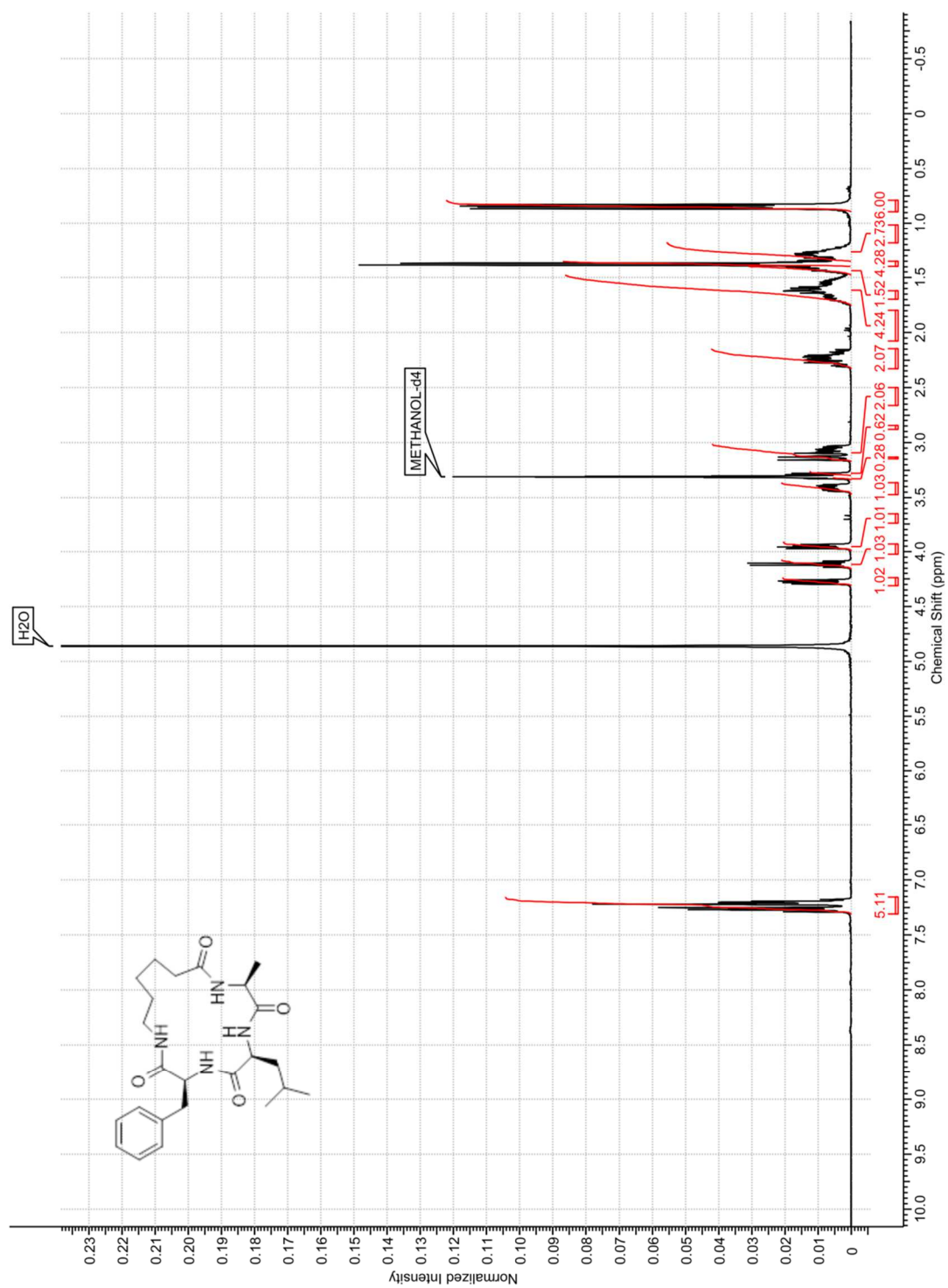


(3S,6S,15S)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-15-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nala-5S) (67)

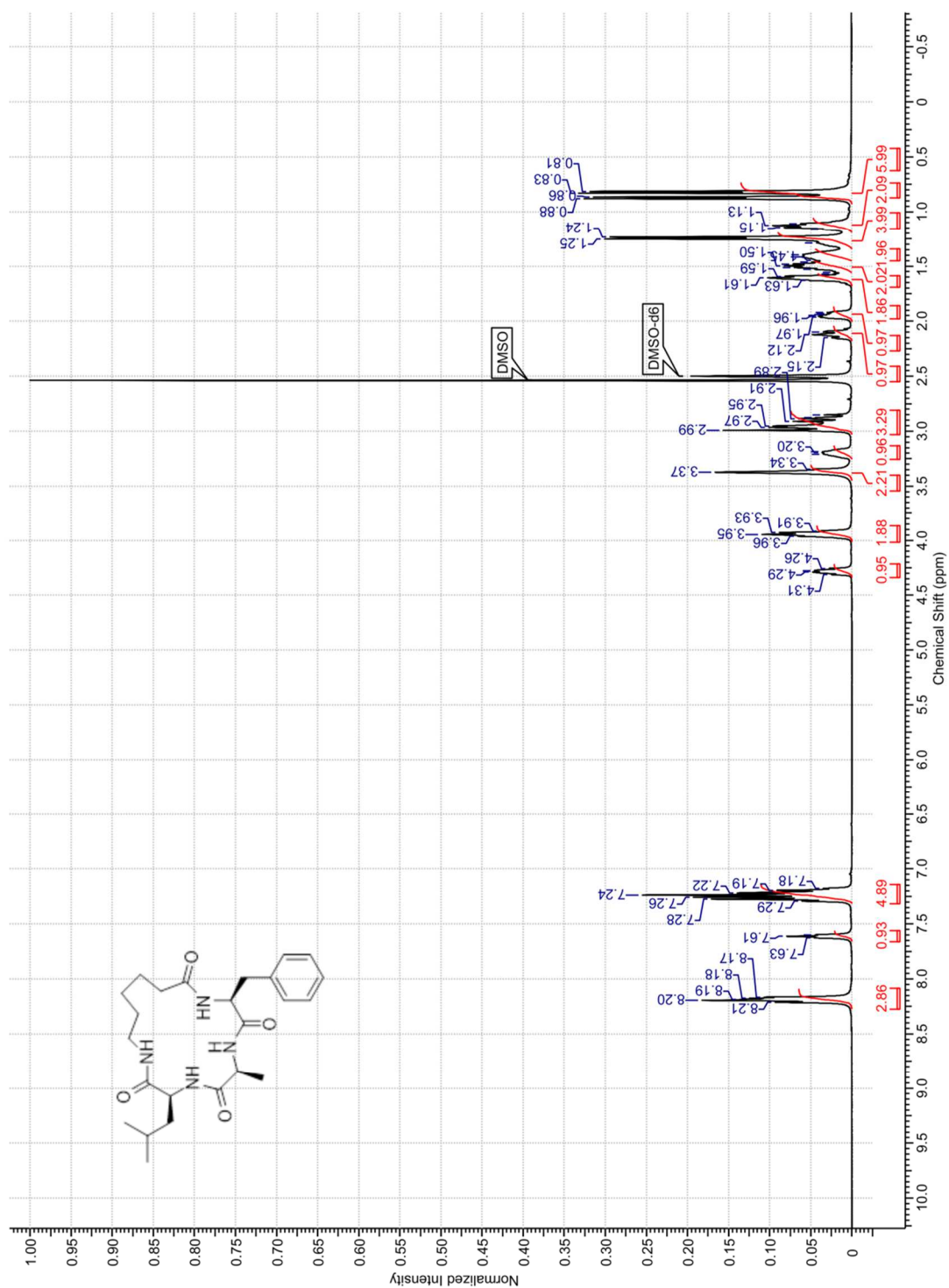


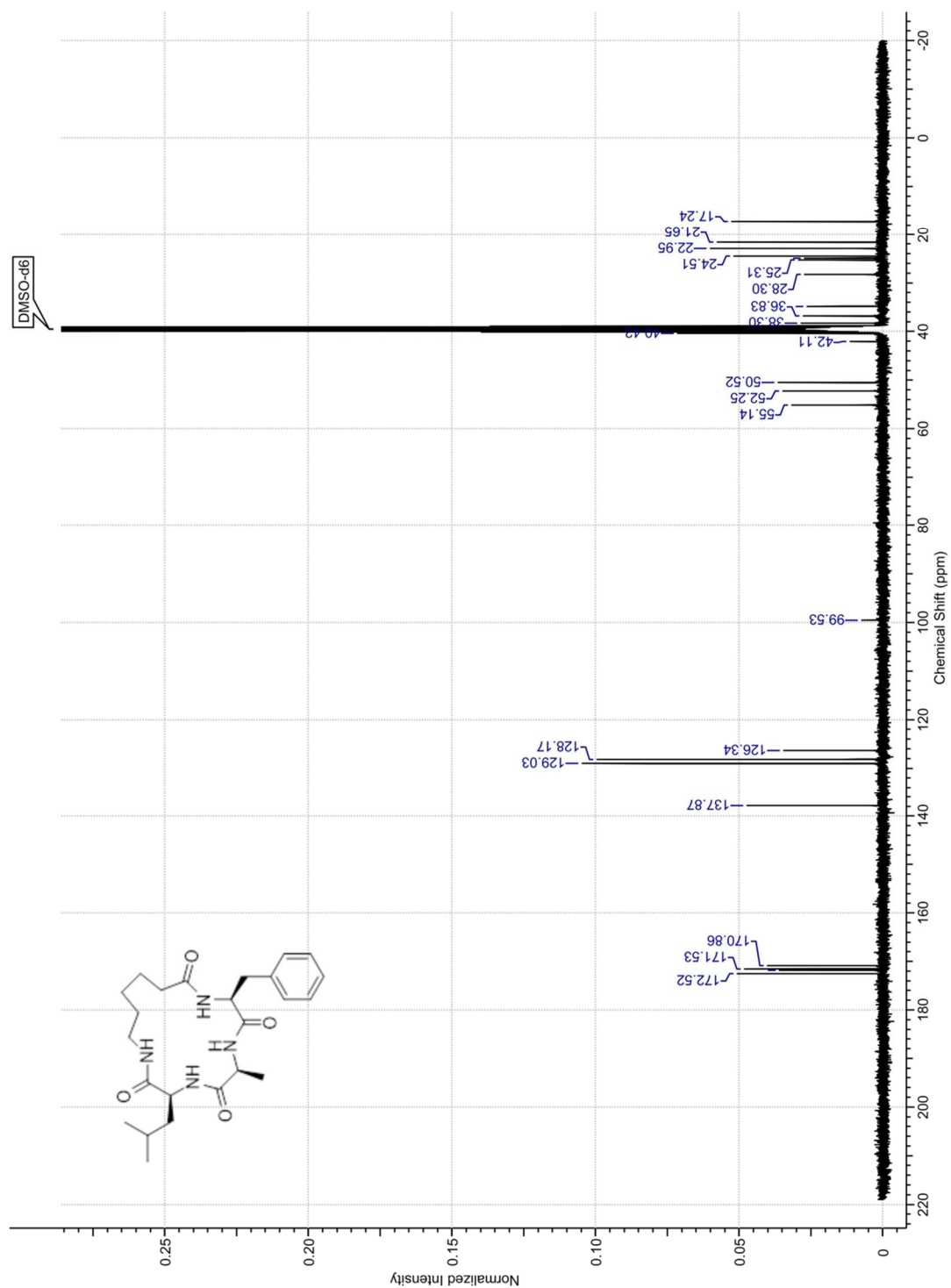


(3*S*,6*S*,9*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclohexadecanetetrone (reg-6) (68)

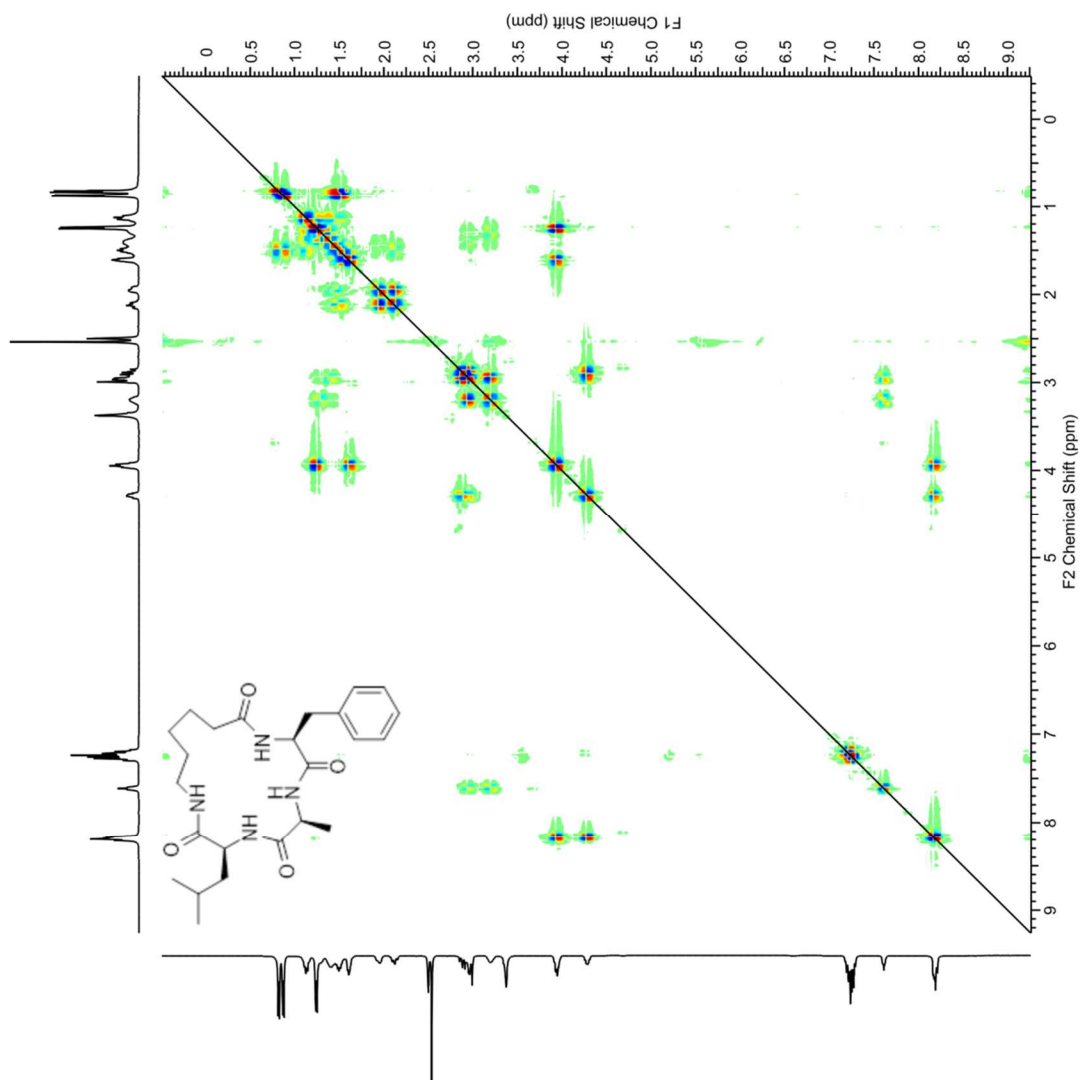


(3*S*,6*S*,9*S*)-9-Benzyl-3-isobutyl-6-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclohexadecanetetron (alt-6) (69)

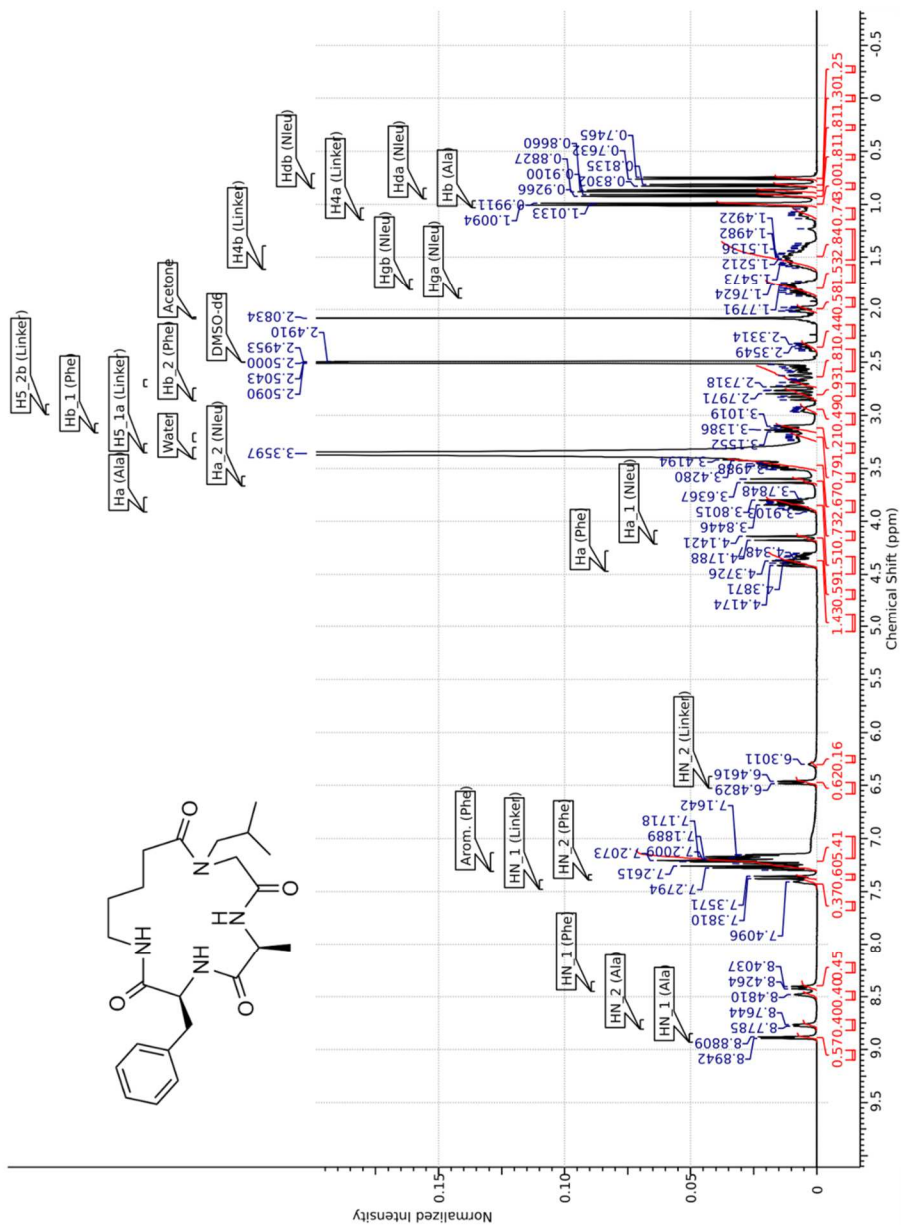




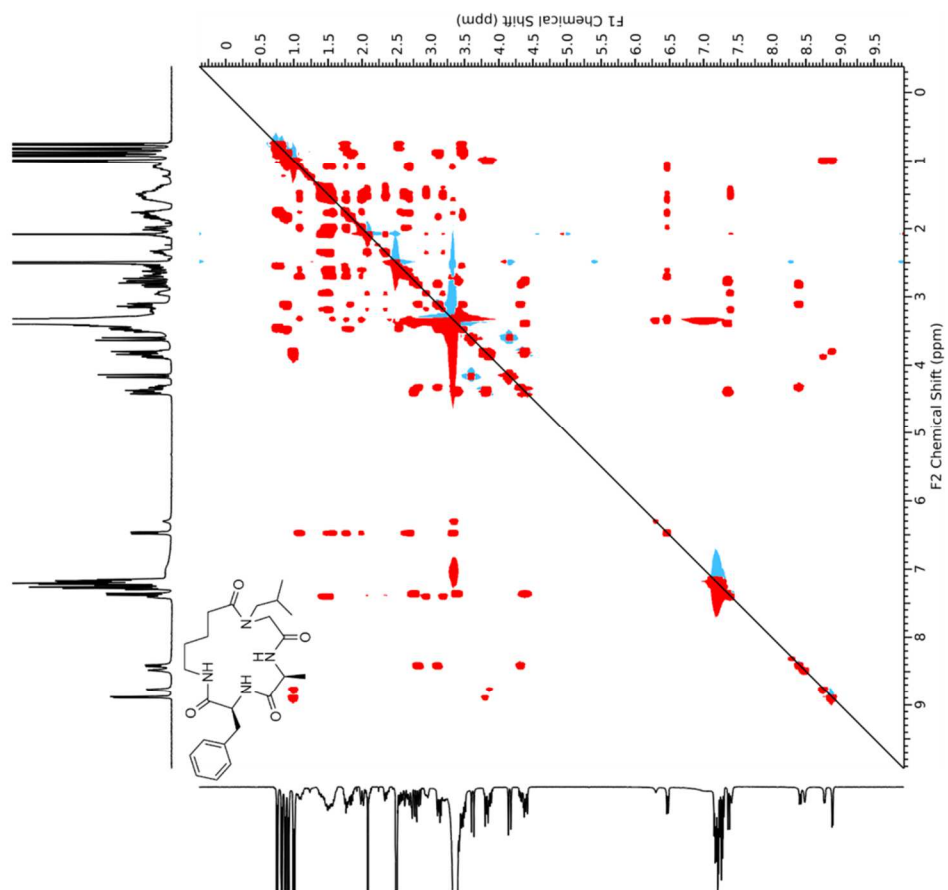
HSQC



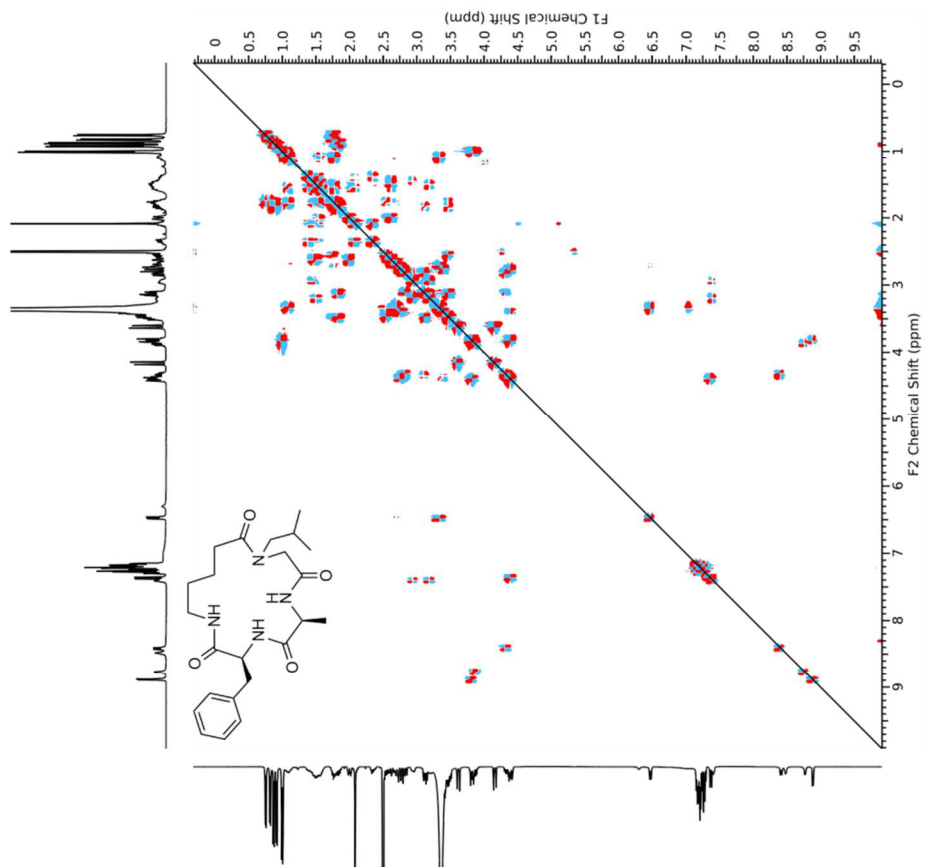
(3S,6S)-3-benzyl-10-isobutyl-6-methyl-1,4,7,10-tetraazacyclopentadecane-2,5,8,11-tetraone (HypA) (70)



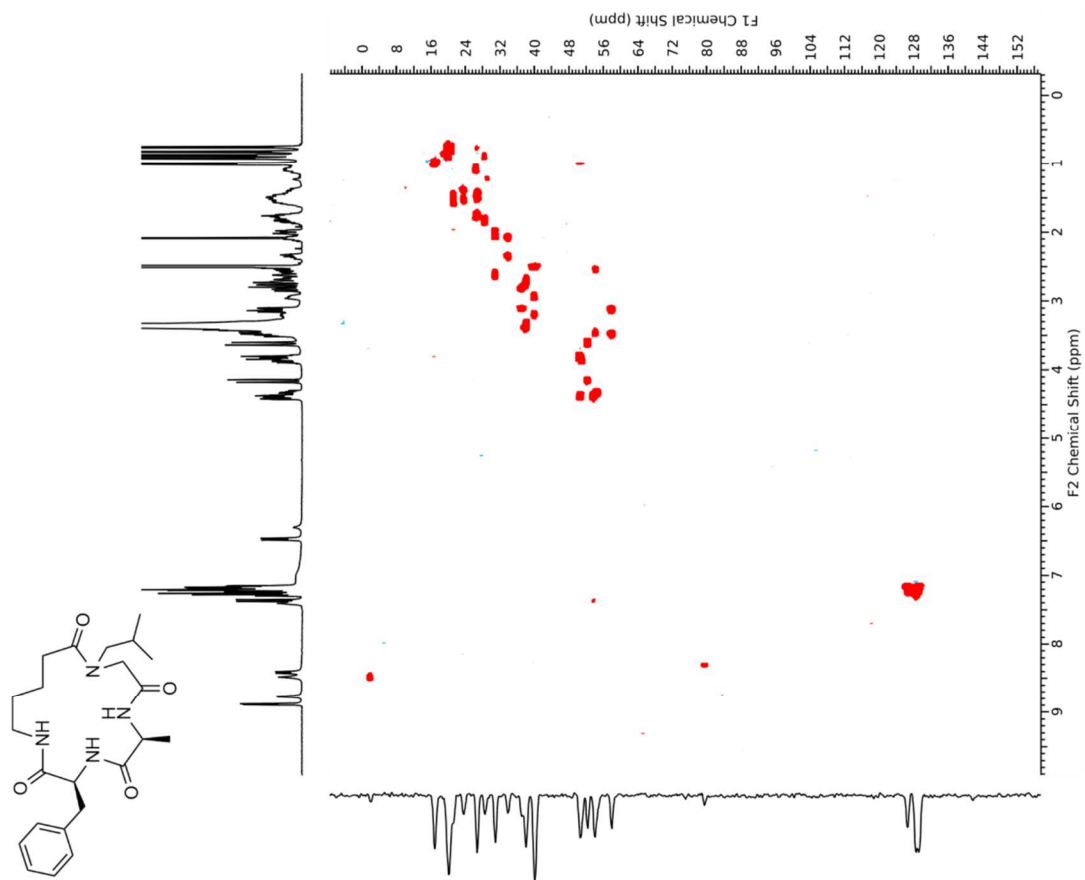
TOCSY



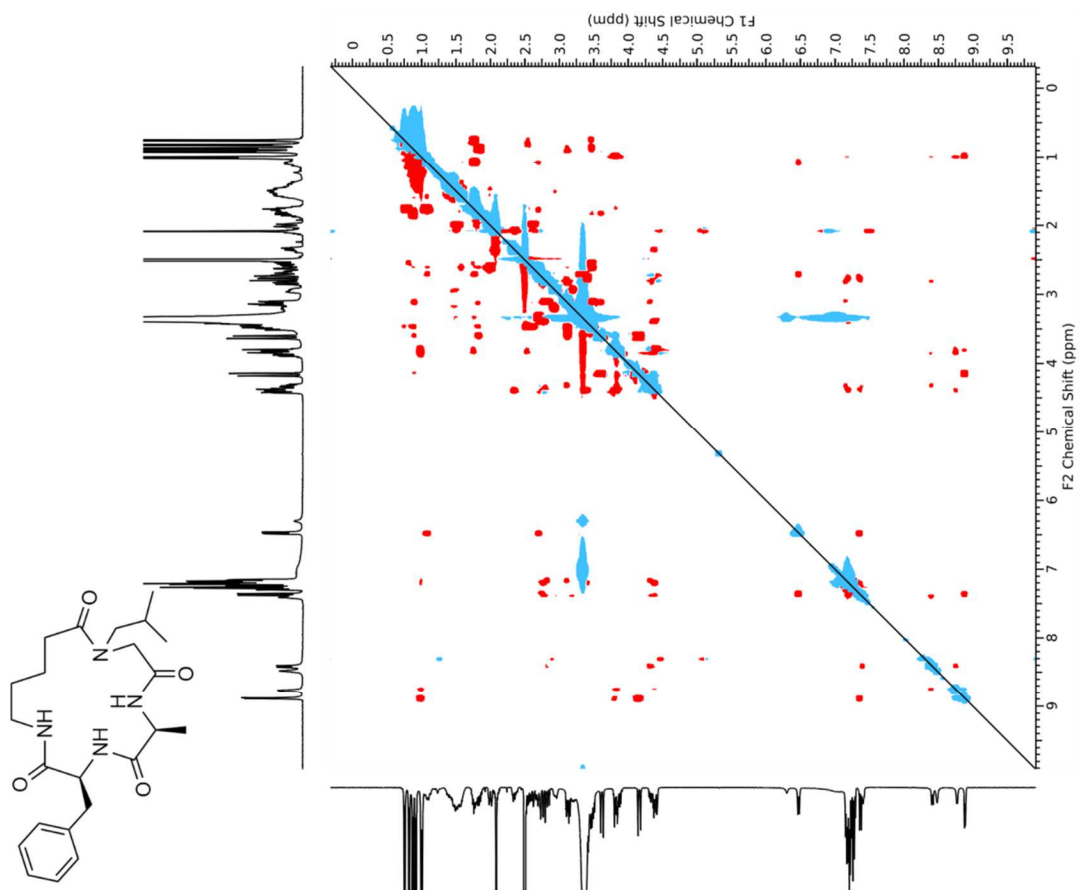
COSY



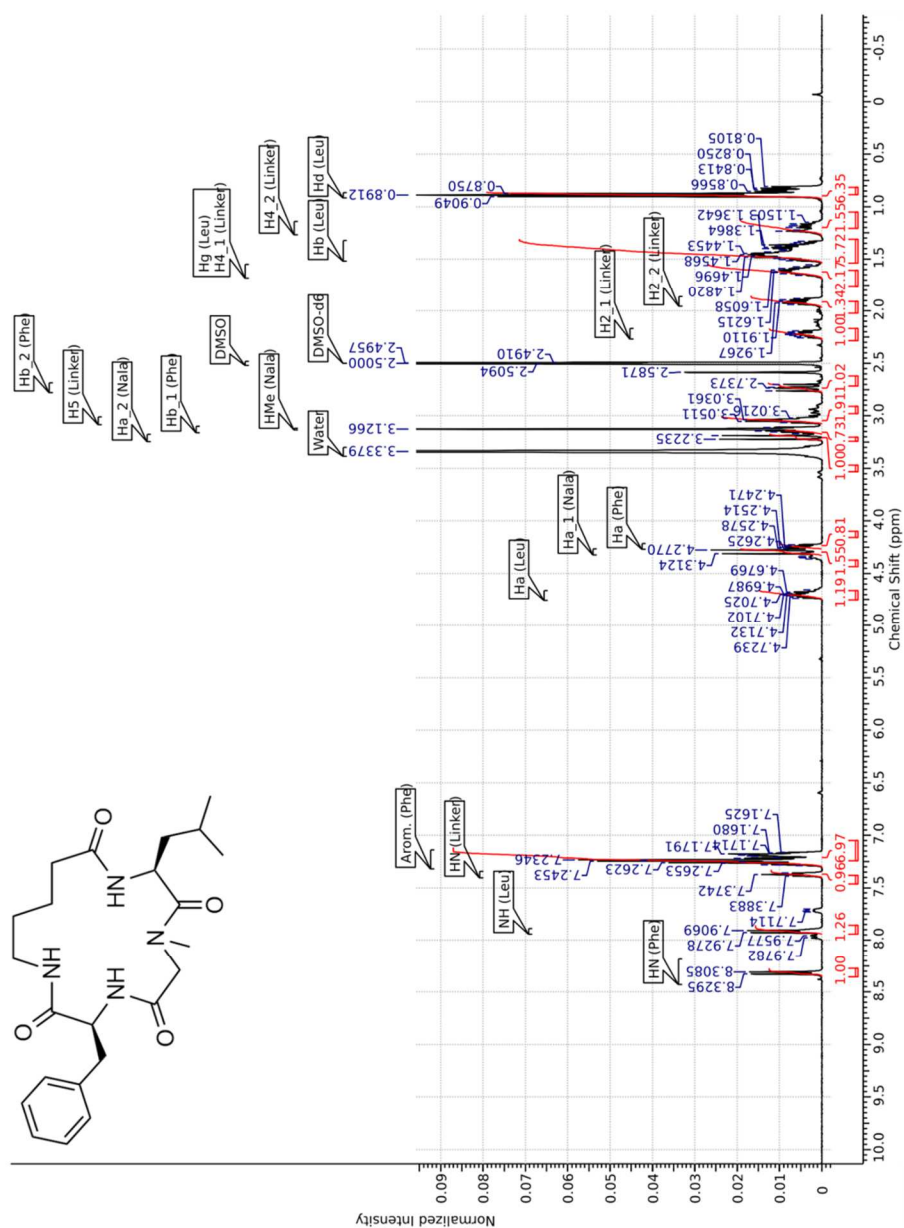
HSQC



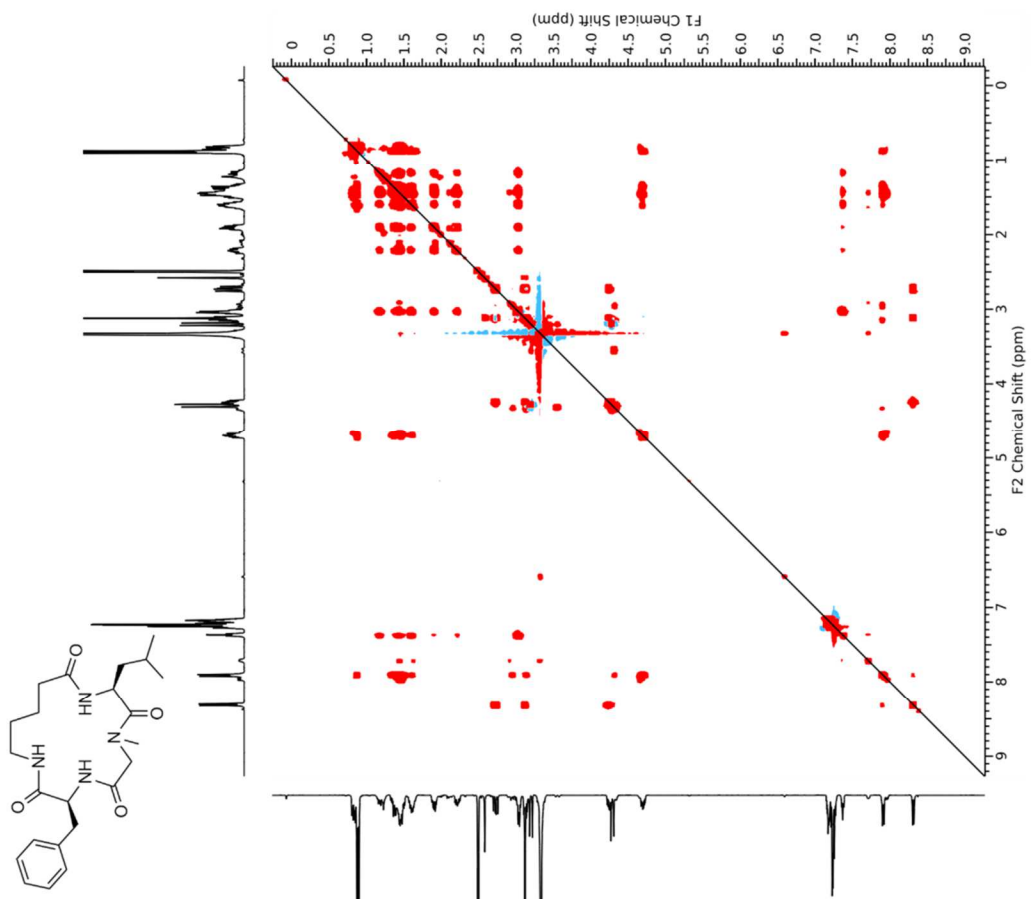
ROESY



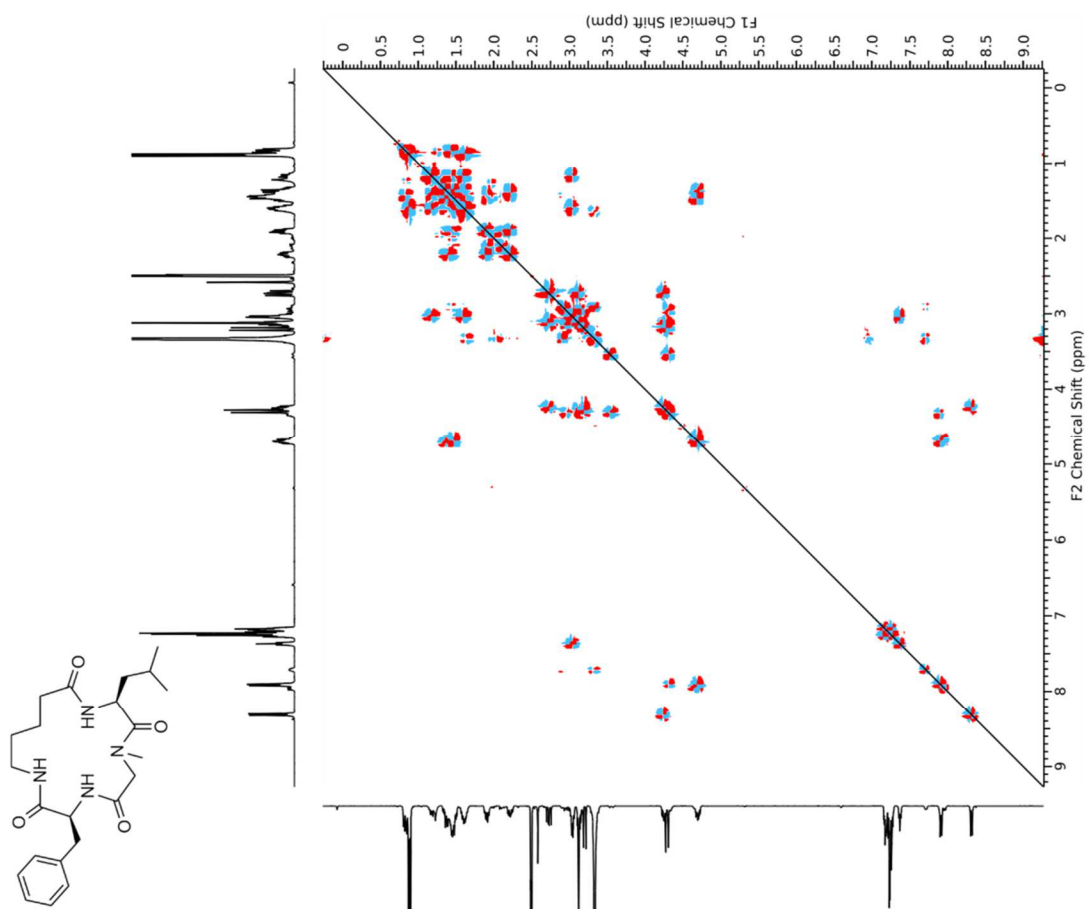
(3S,9S)-3-benzyl-9-isobutyl-7-methyl-1,4,7,10-tetraazacyclopentadecane-2,5,8,11-tetraone (HypB) (71)



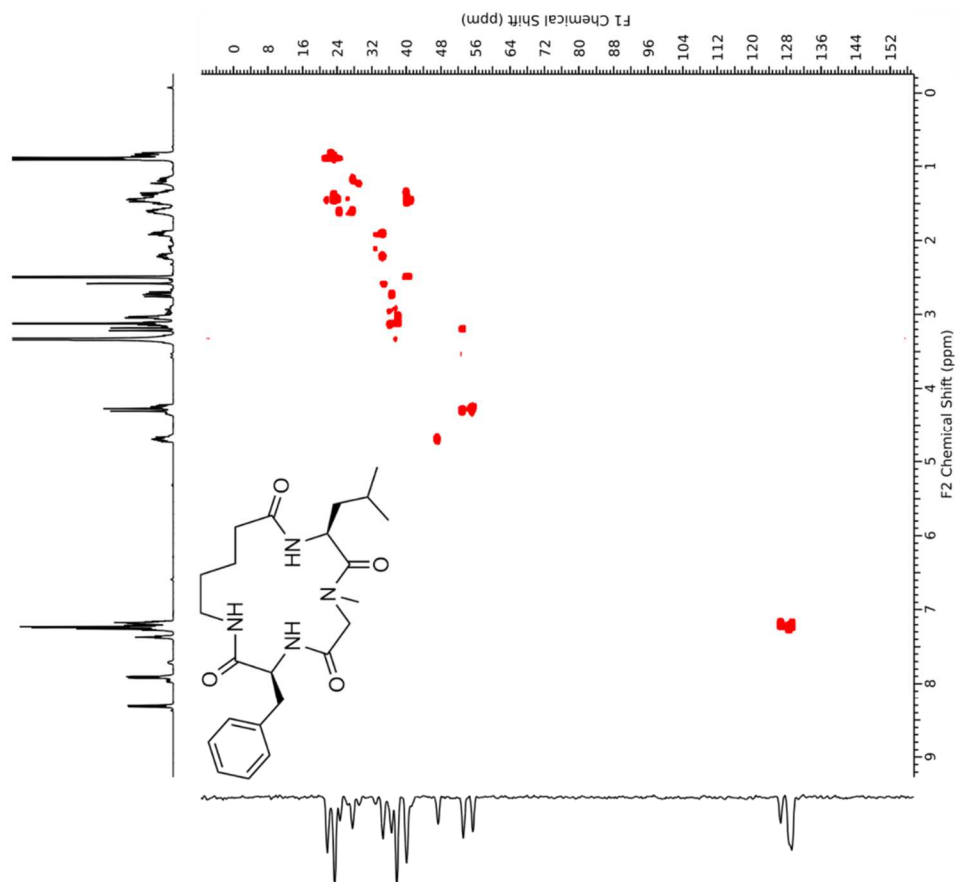
TOCSY



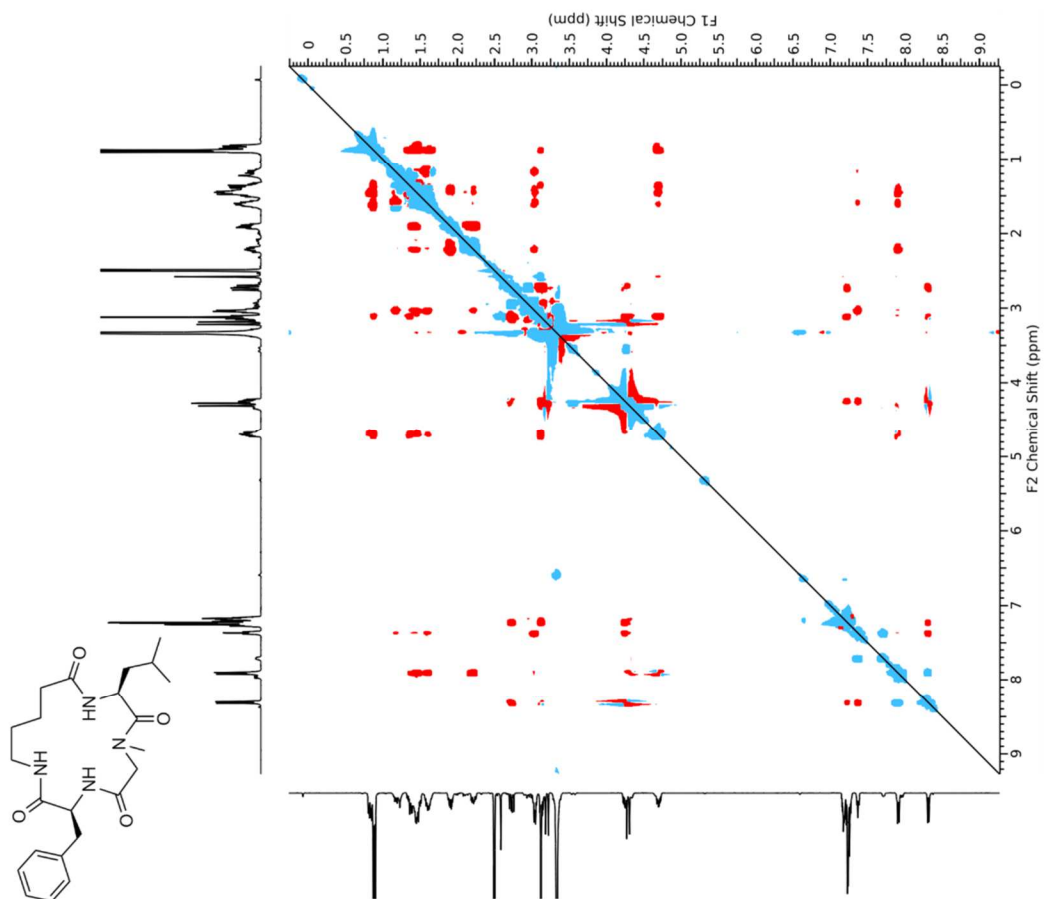
COSY



HSQC

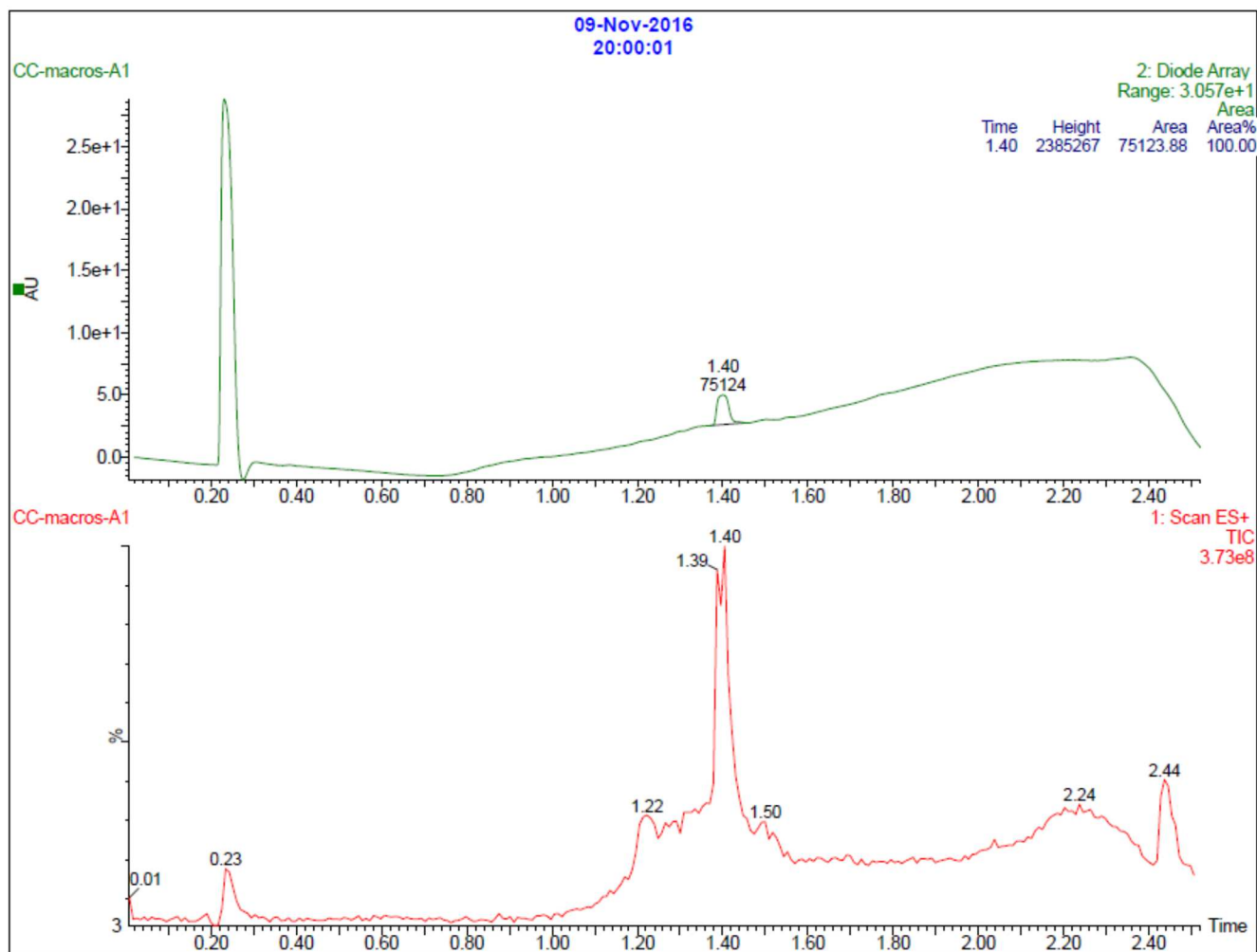
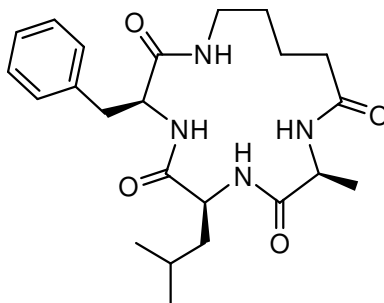


ROESY

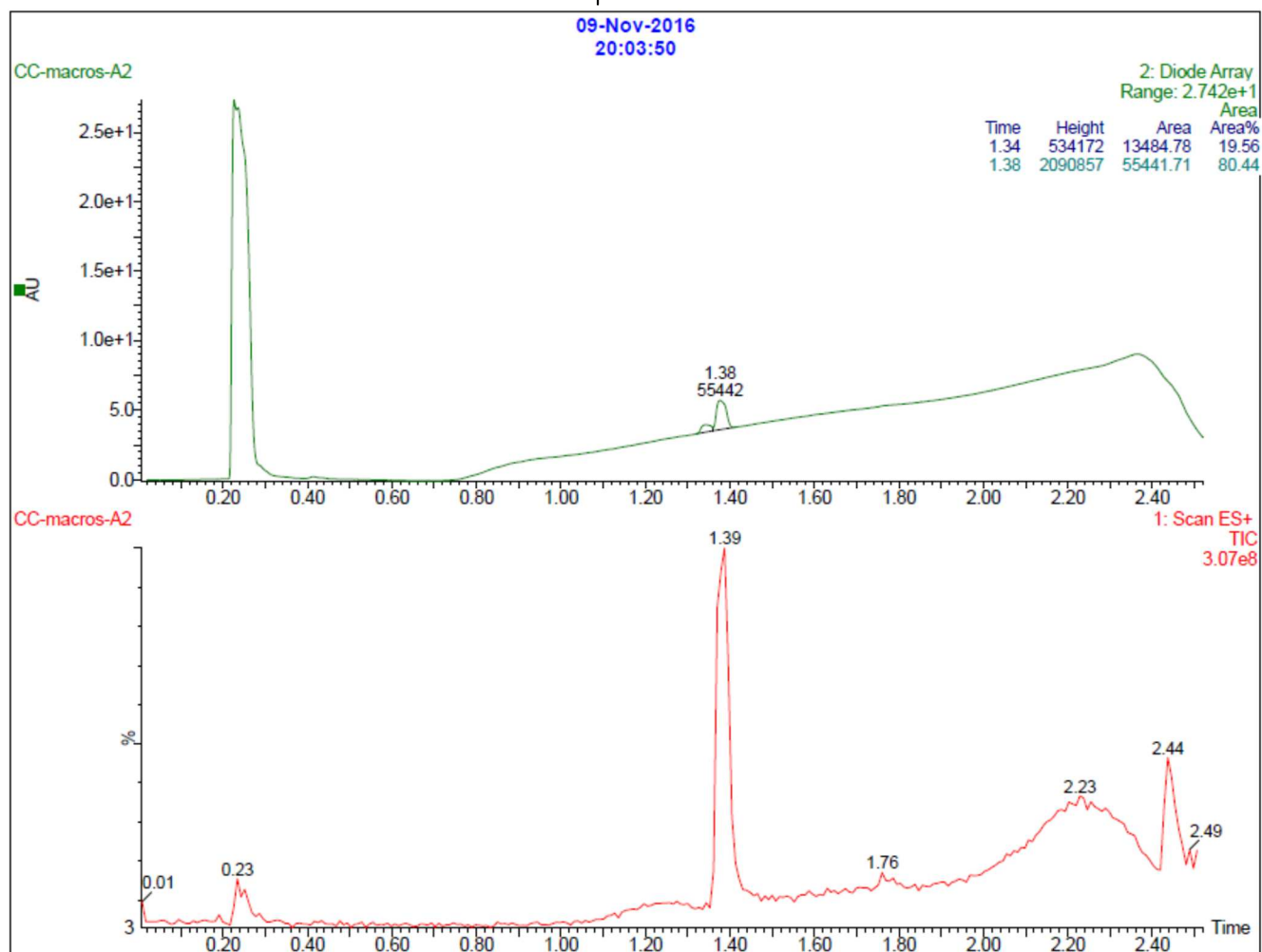
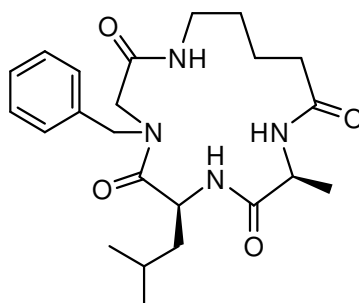


ANNEXE 3 : SPECTRES UPLC-MS

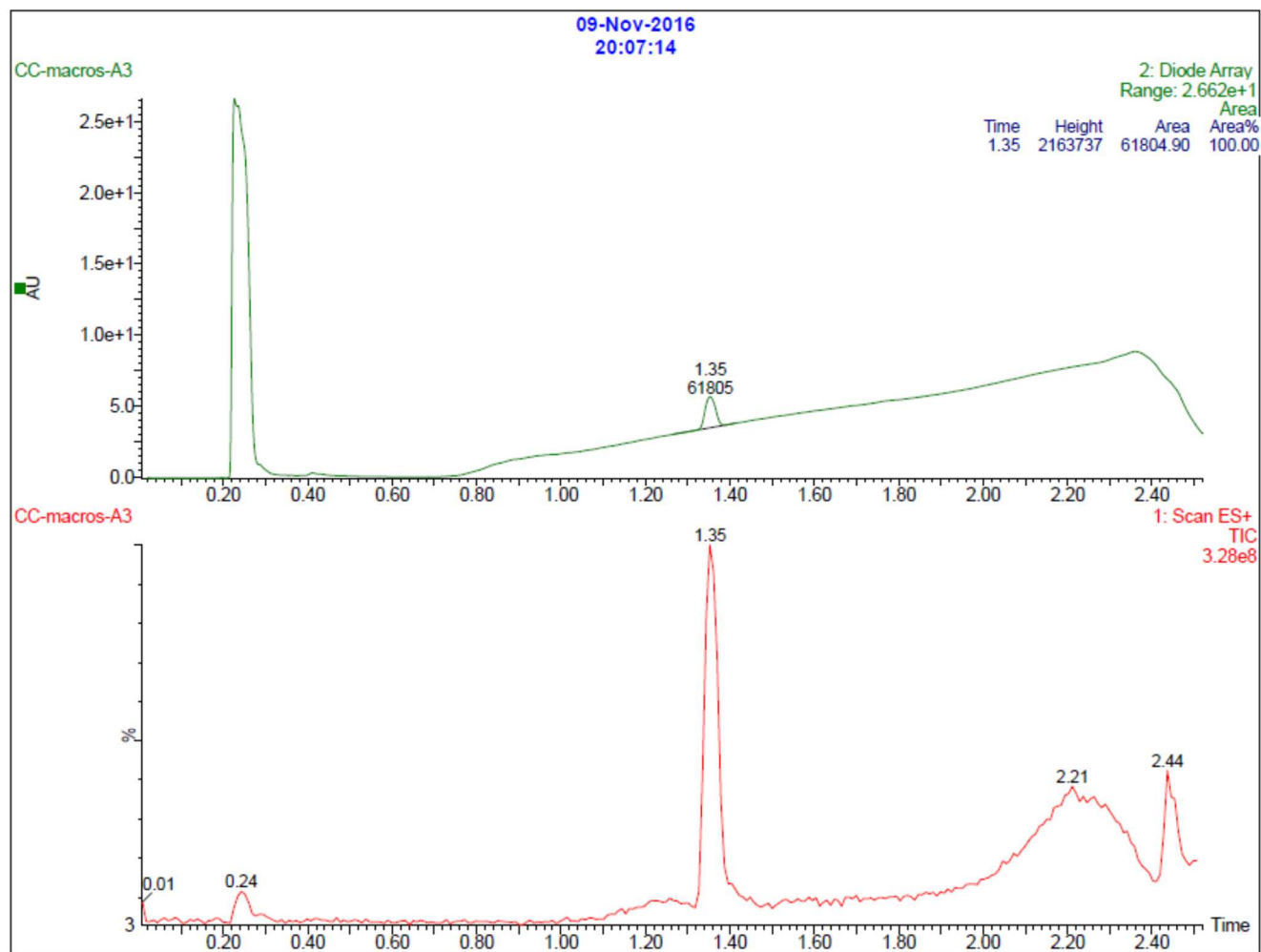
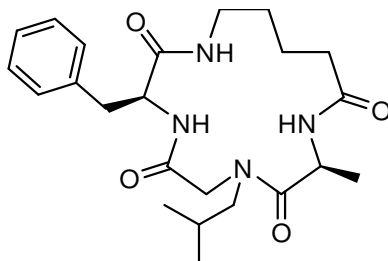
(3*S*,6*S*,9*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Ø-Ø)
(32)



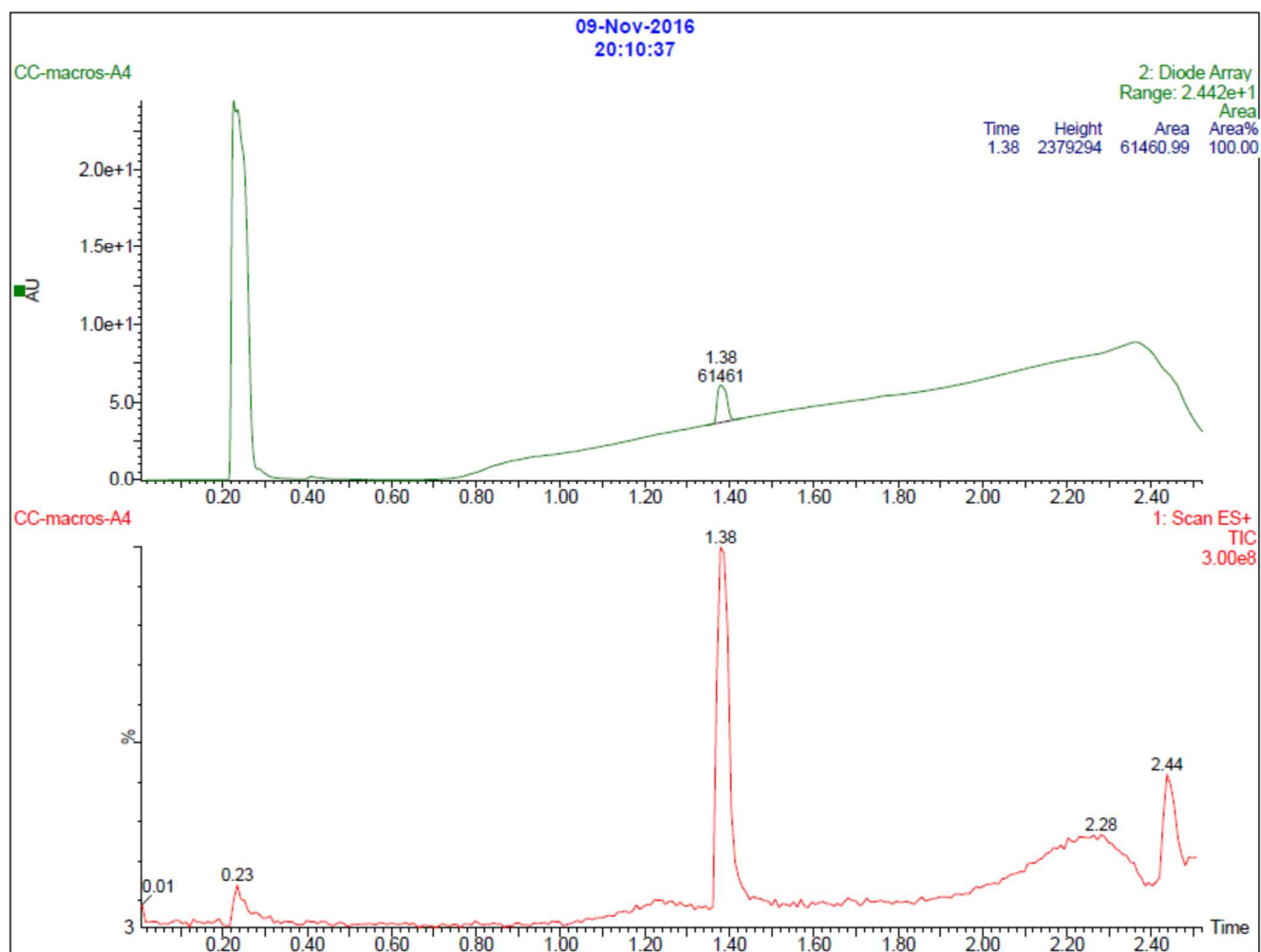
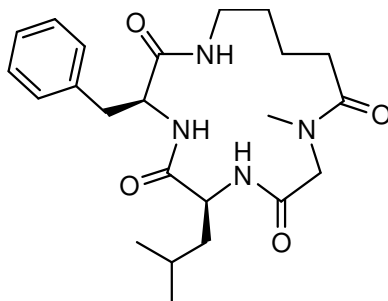
(6*S*,9*S*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nphe-Ø)
(33)



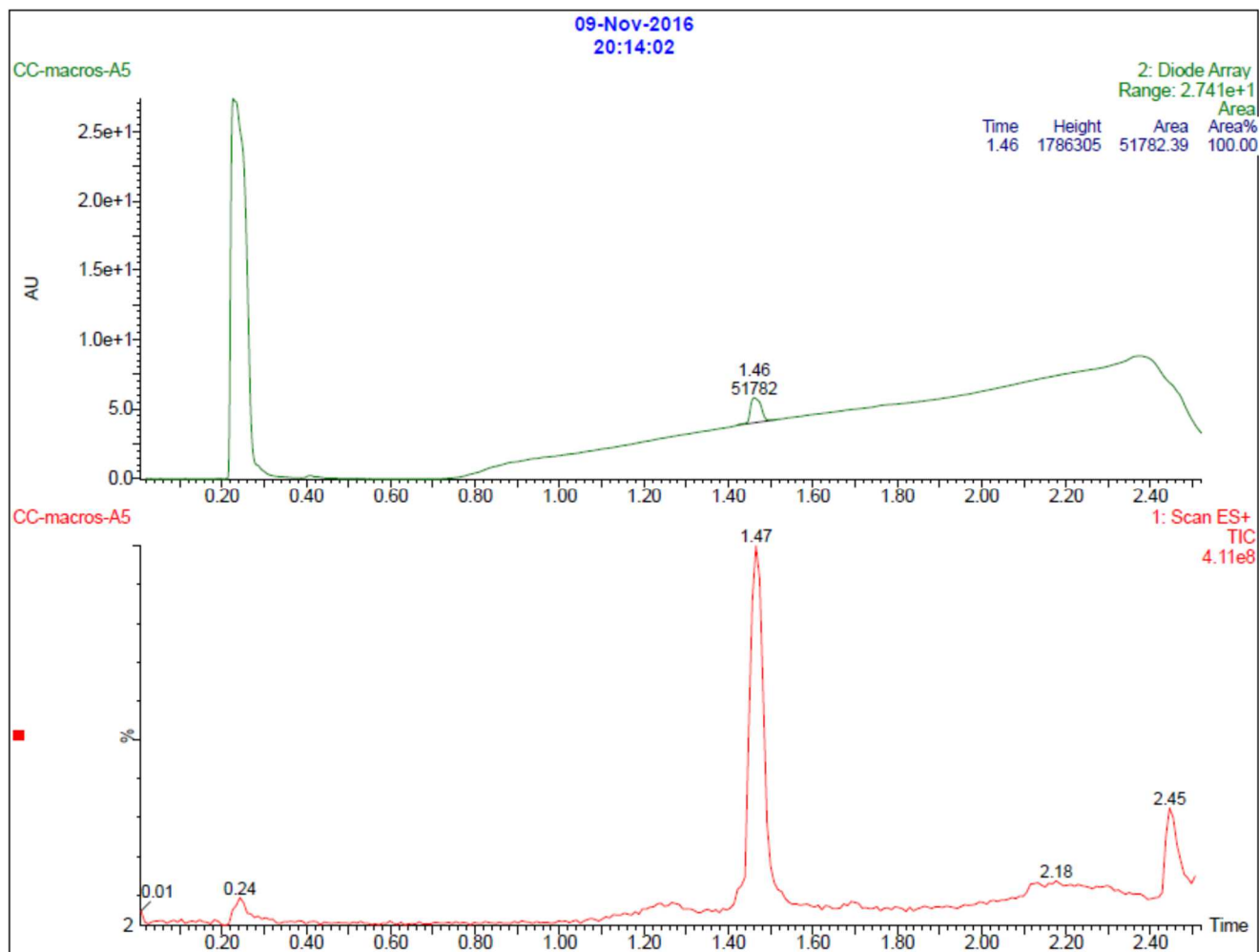
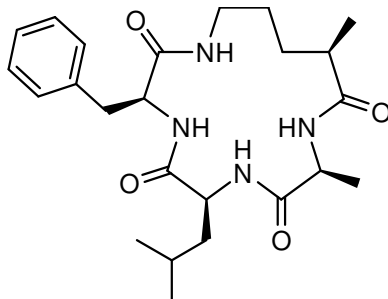
(3*S*,9*S*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nleu-Ø)
(34)



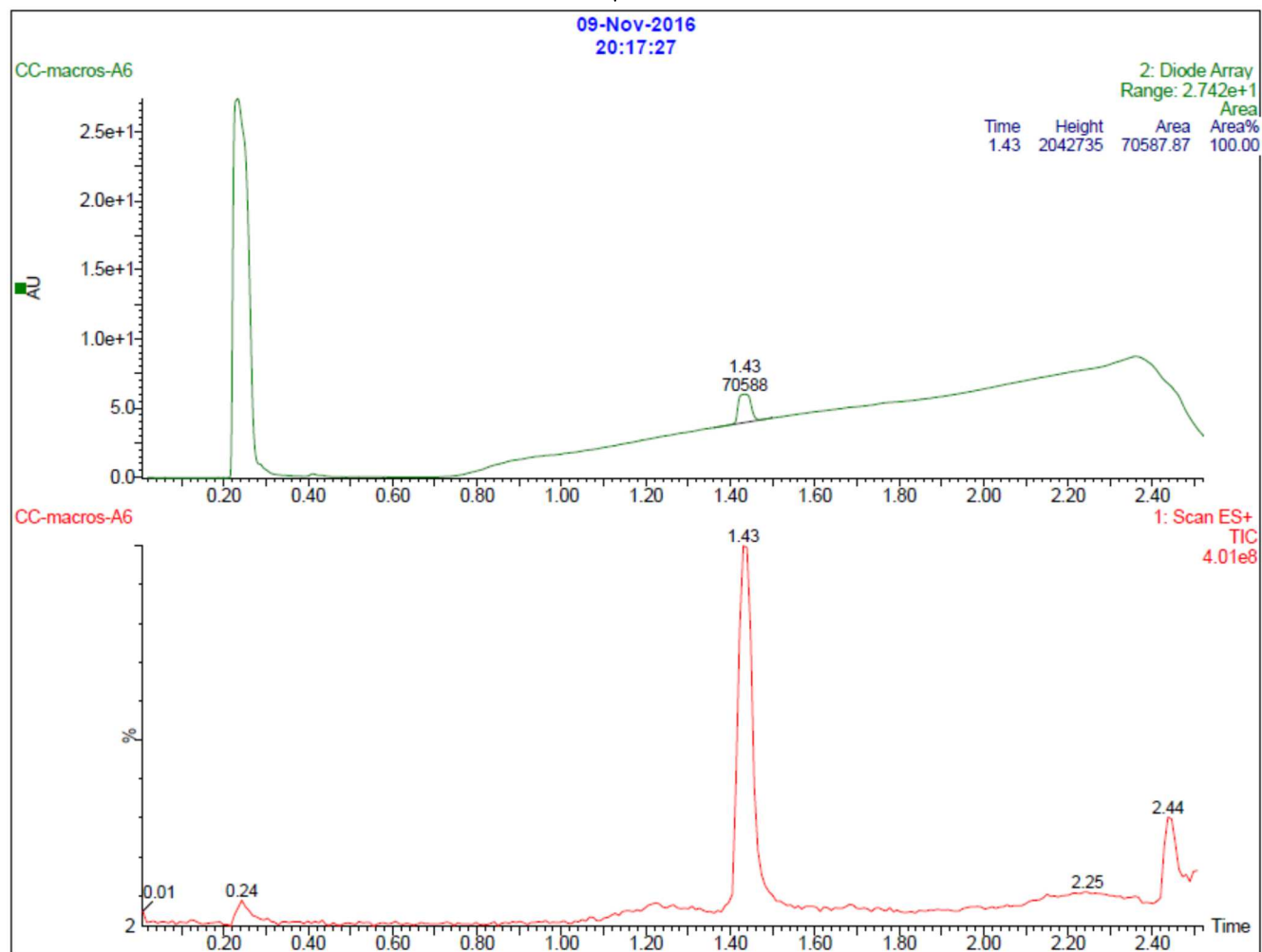
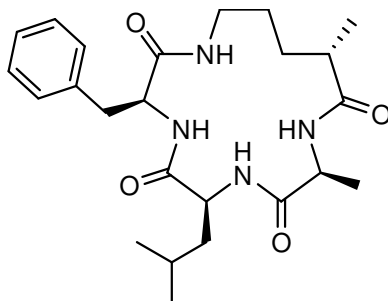
(3S,6S)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nala-Ø)
(35)



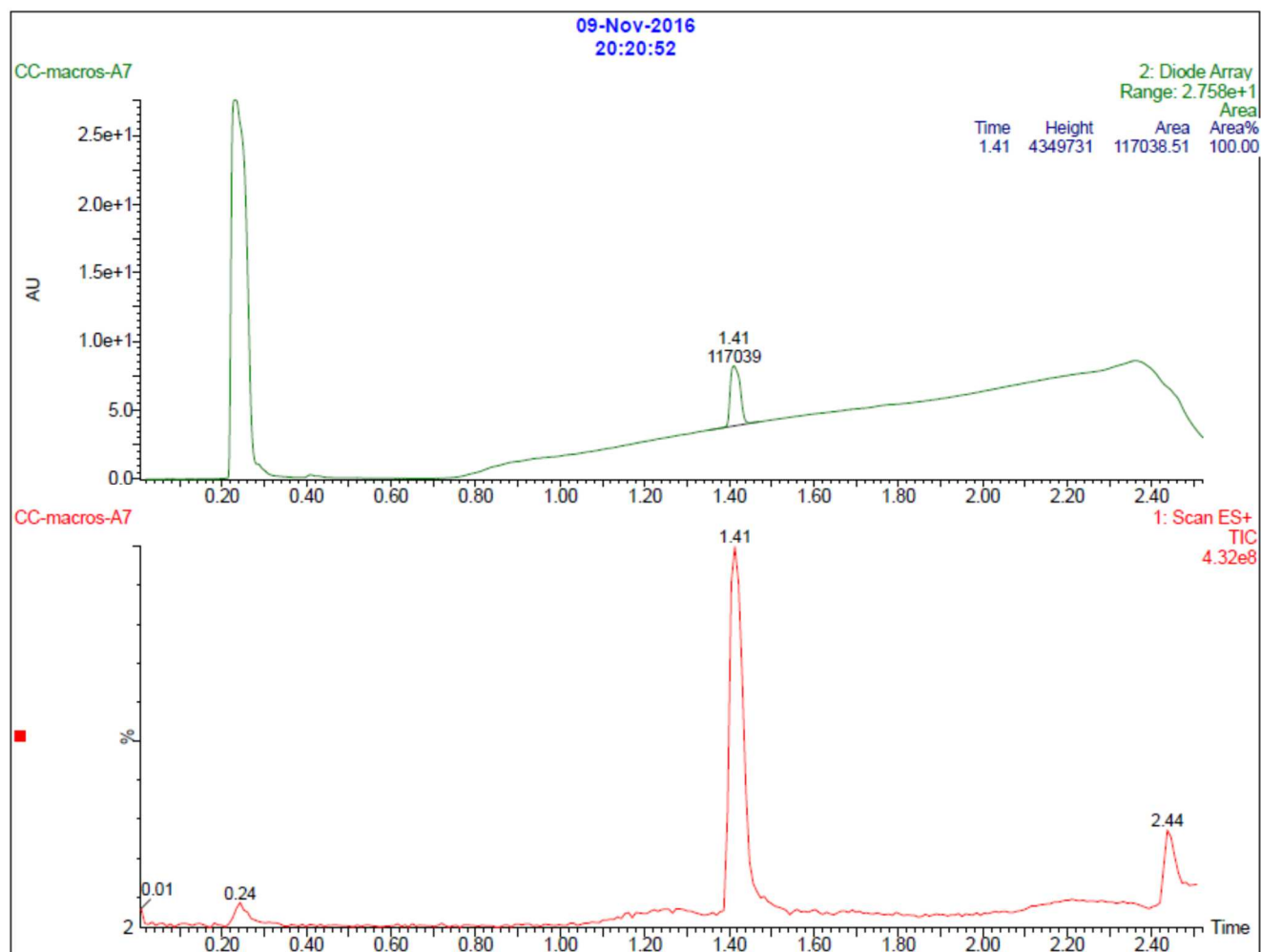
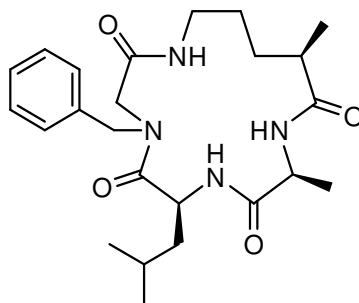
**(3*S*,6*S*,9*S*,12*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,12-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetra-
ne (Ø-2*R*) (36)**



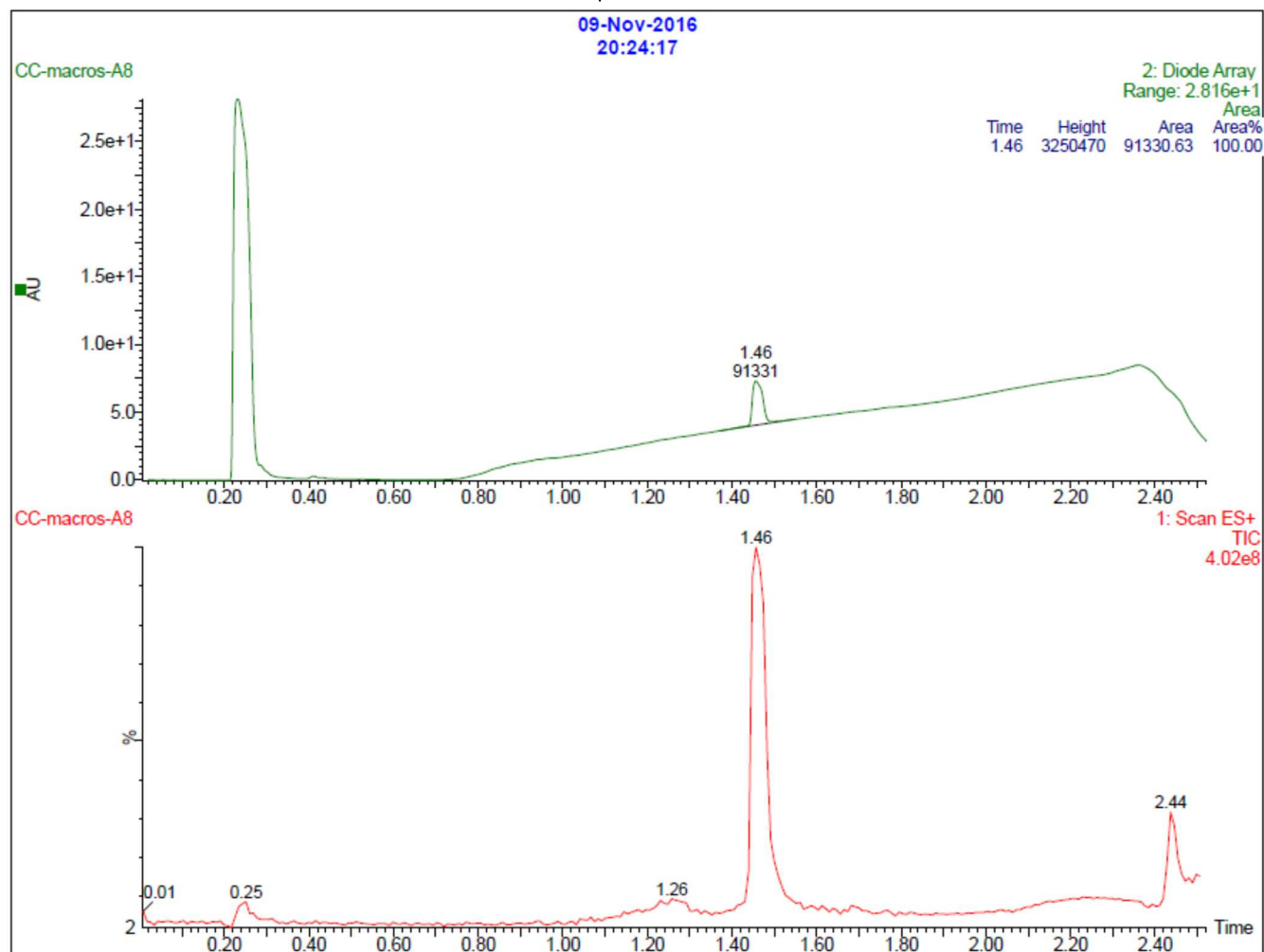
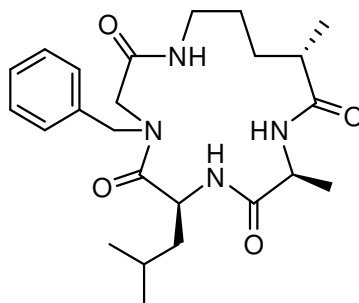
**(3*S*,6*S*,9*S*,12*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,12-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron
e (Ø-2*S*) (37)**



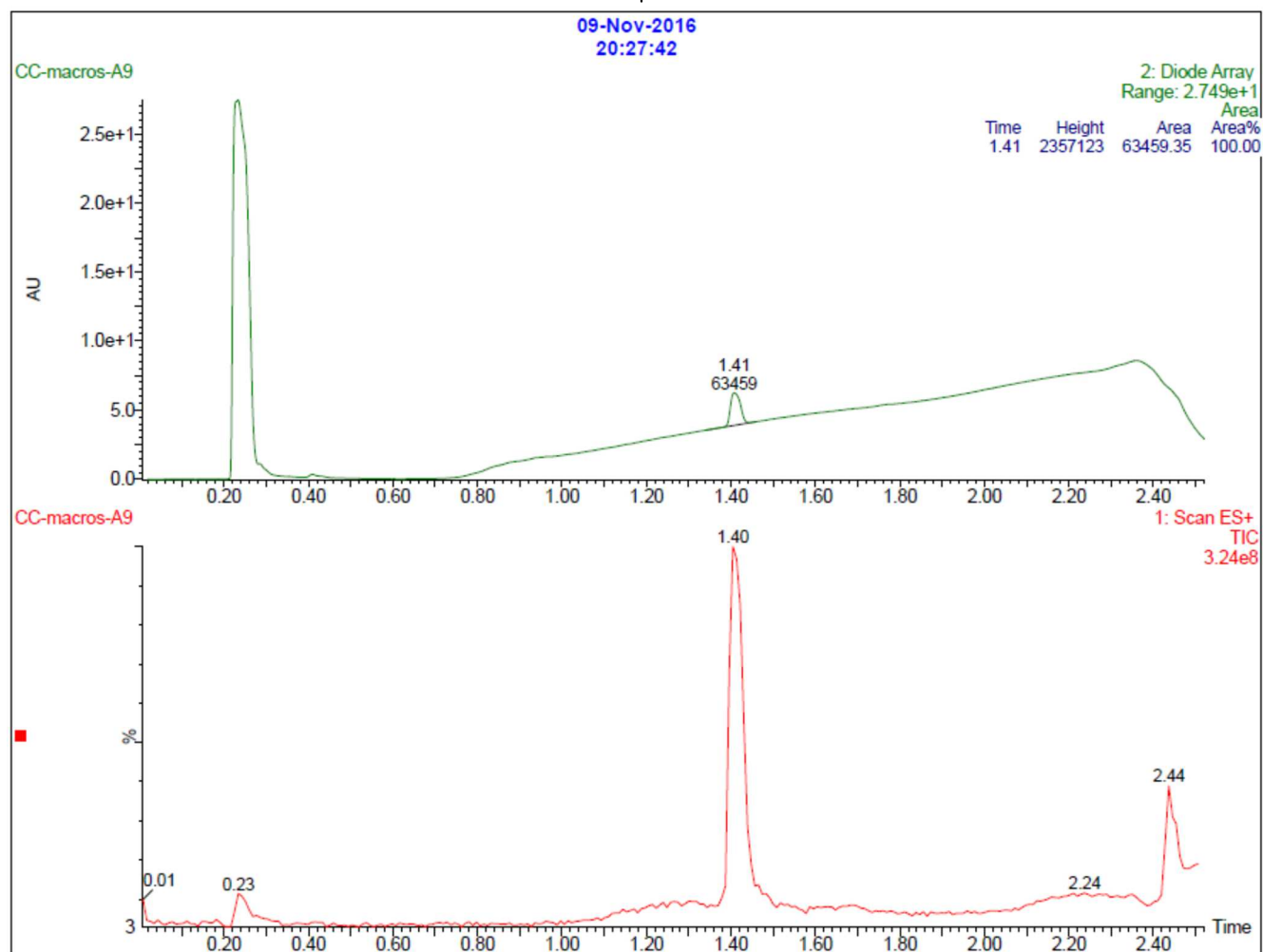
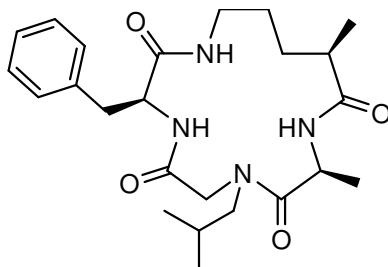
(6*S*,9*S*,12*R*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,12-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nphe-2R) (38)



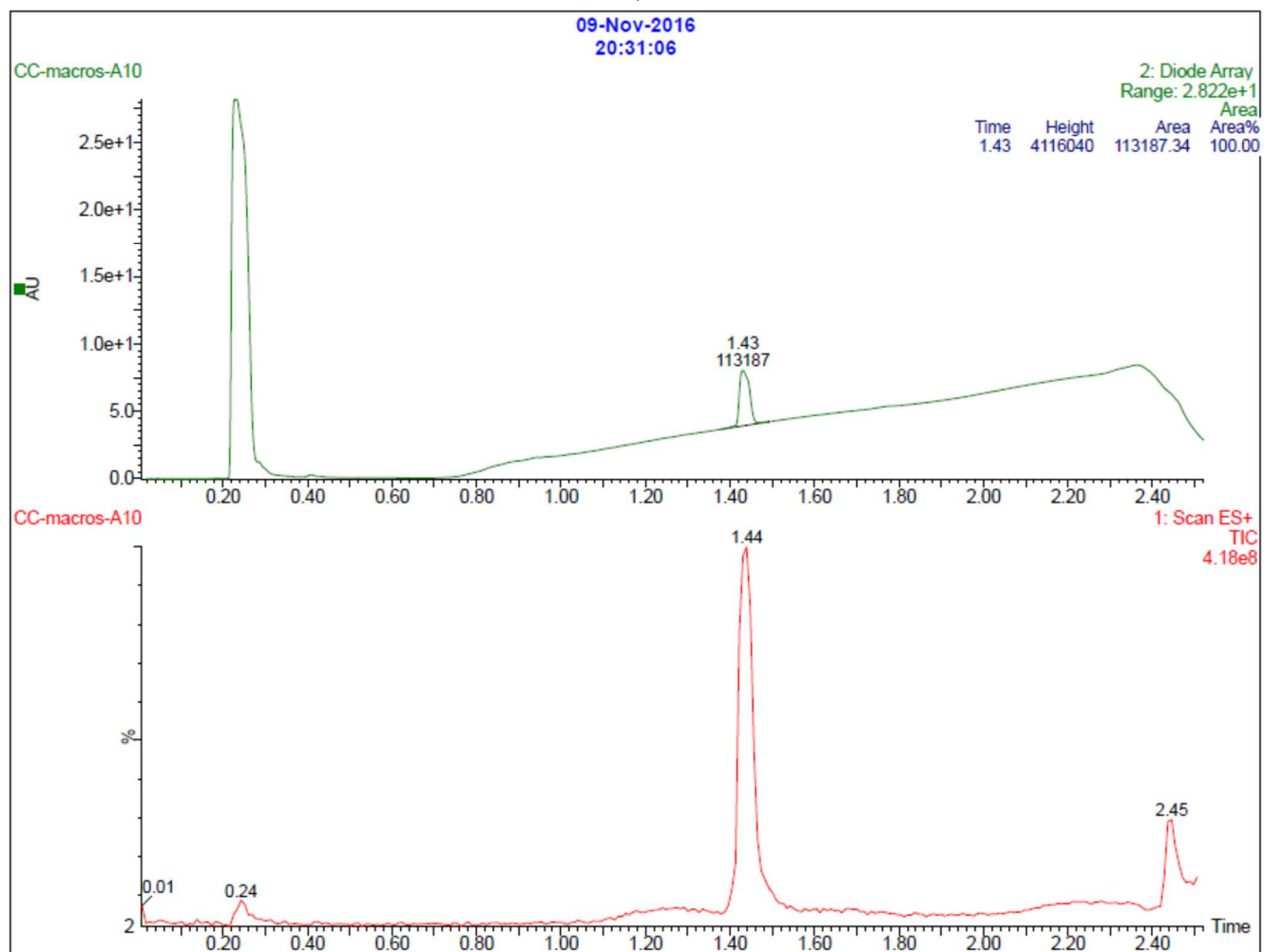
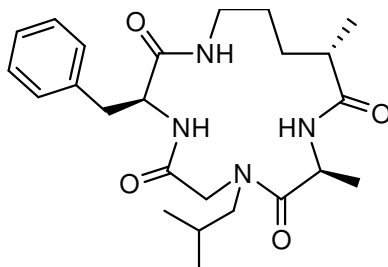
(6*S*,9*S*,12*S*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,12-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nphe-2*S*) (39)



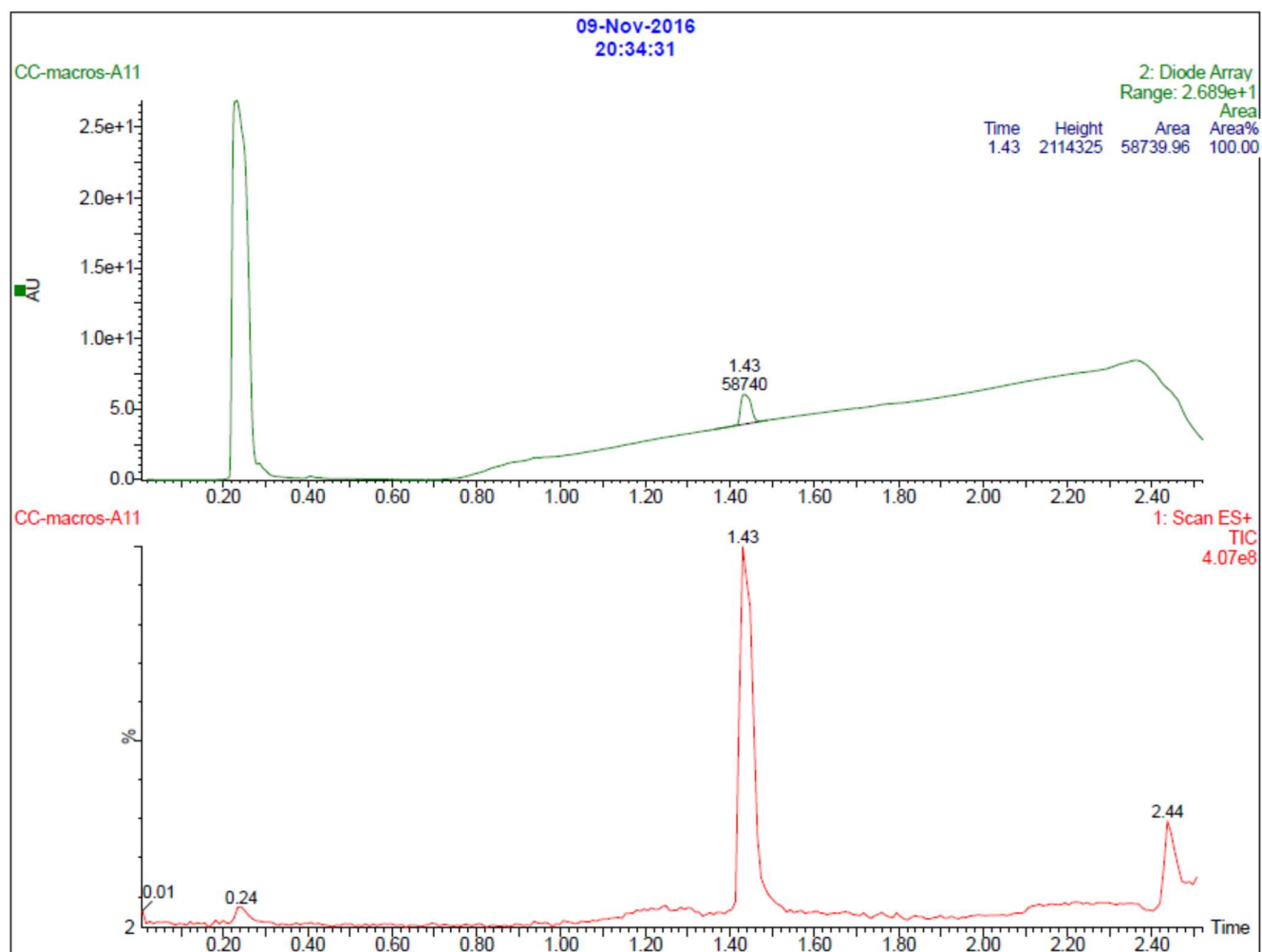
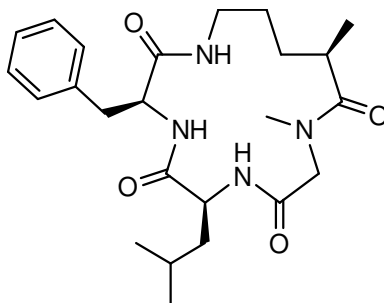
**(3*S*,9*S*,12*R*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,12-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone
(Nleu-2R) (40)**



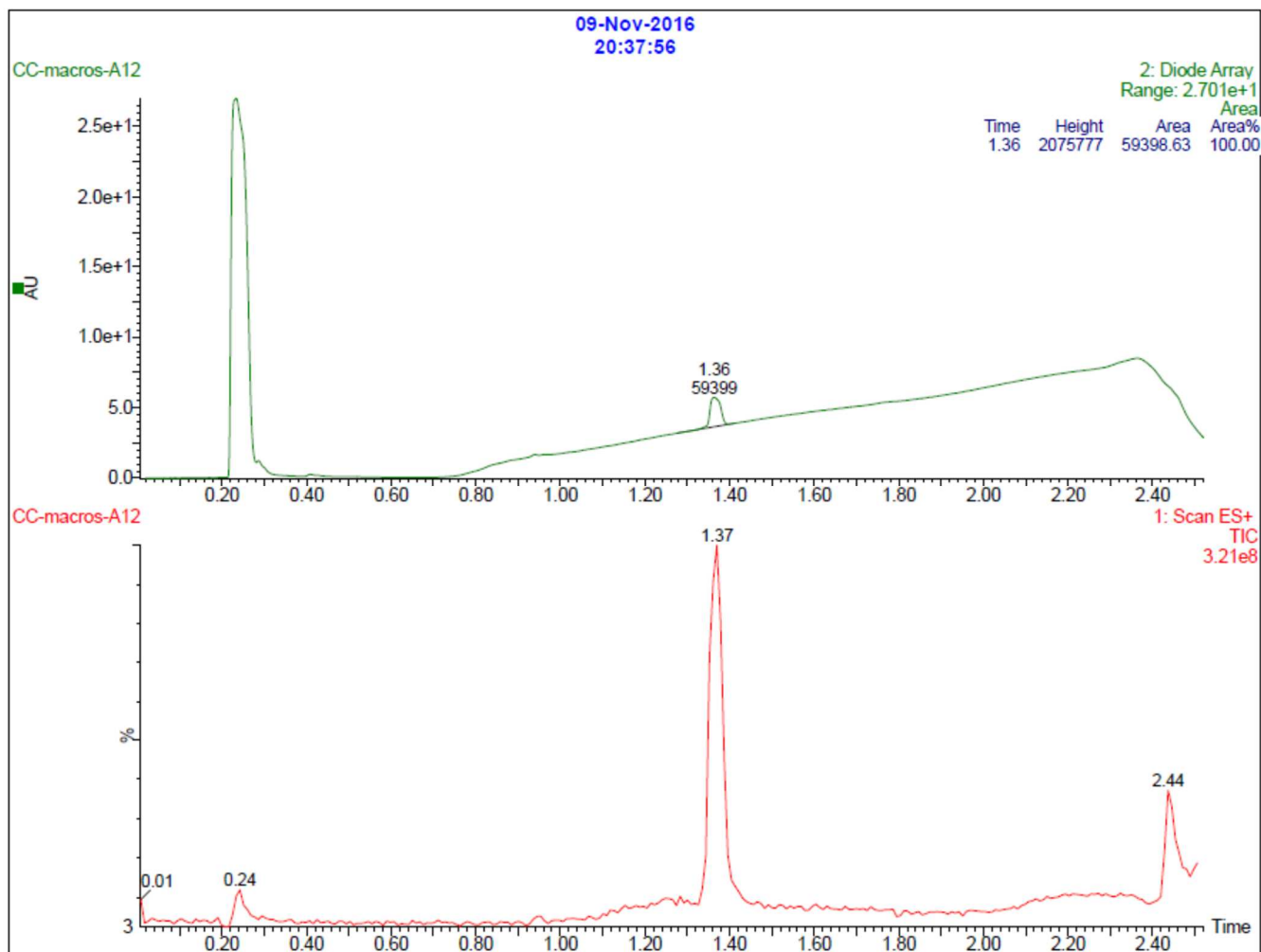
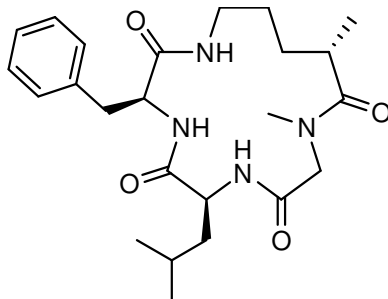
**(3*S*,9*S*,12*S*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,12-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone
(Nleu-2*S*) (41)**



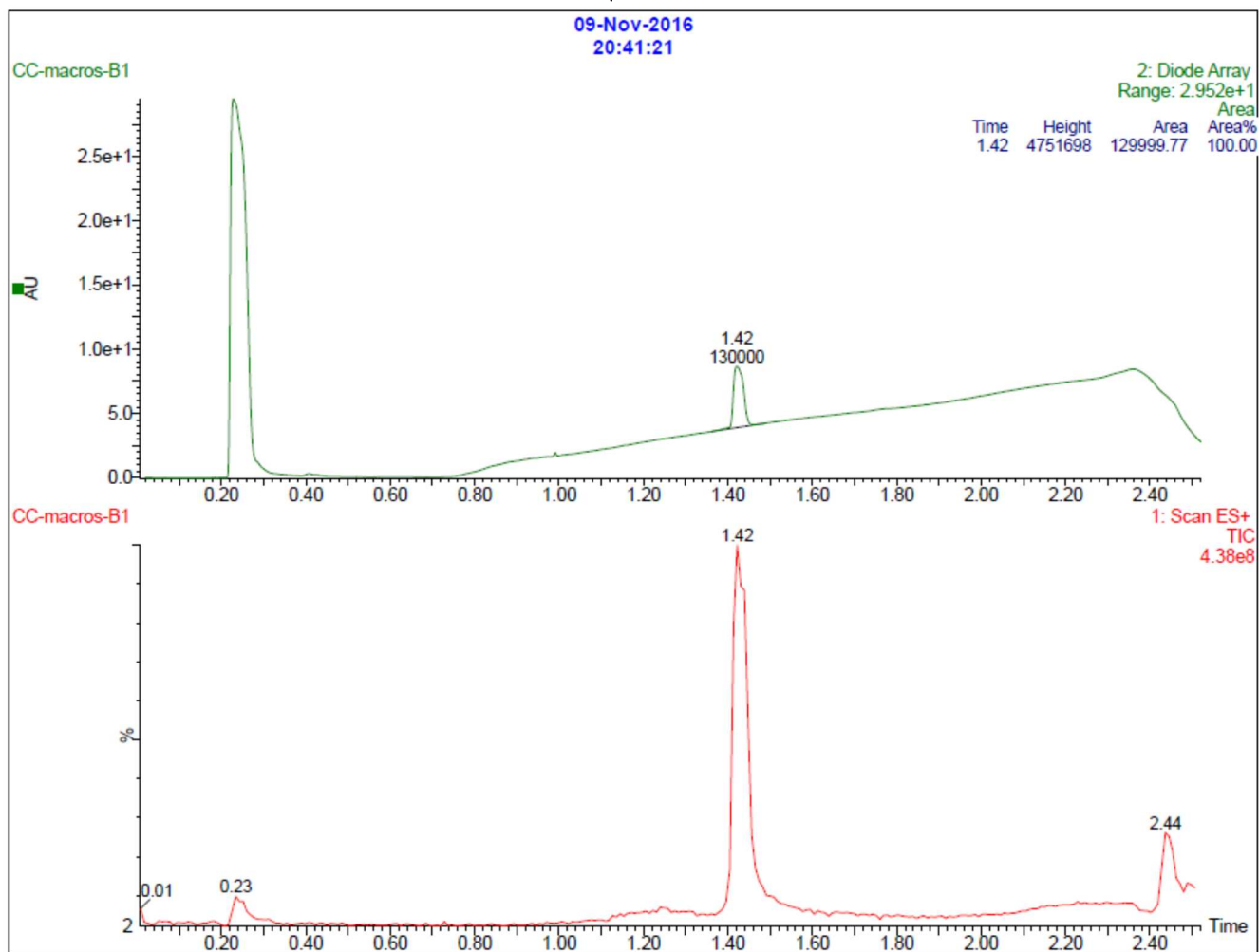
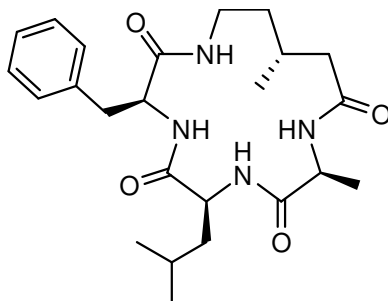
(3*S*,6*S*,12*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-12-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetrone (Nala-2R) (42)



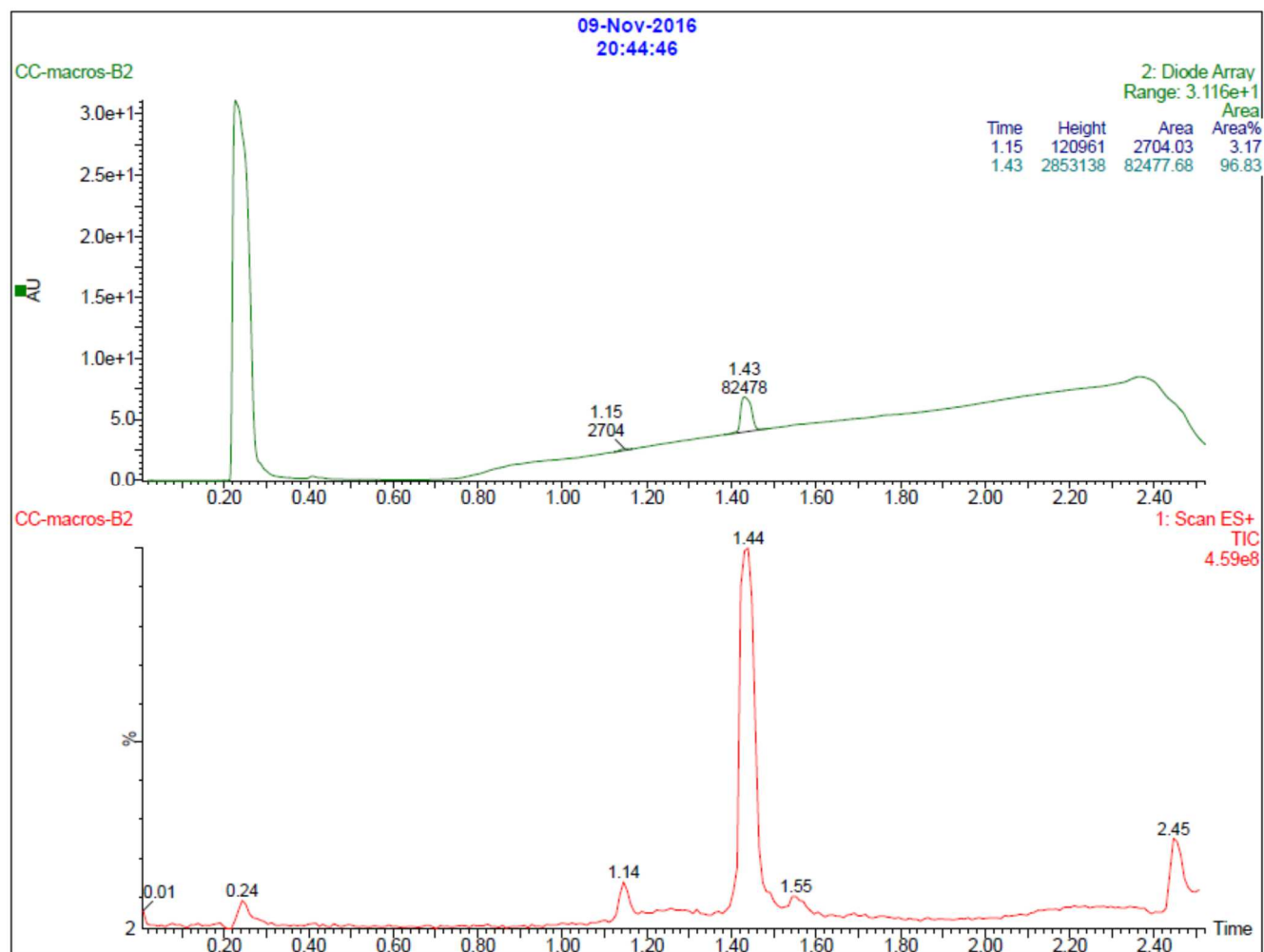
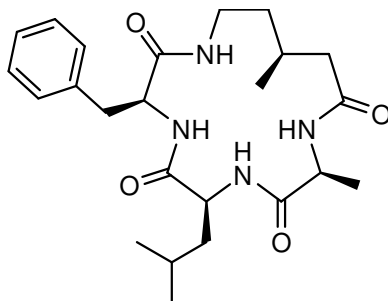
(3*S*,6*S*,12*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-12-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetrone (Nala-2*S*) (43)



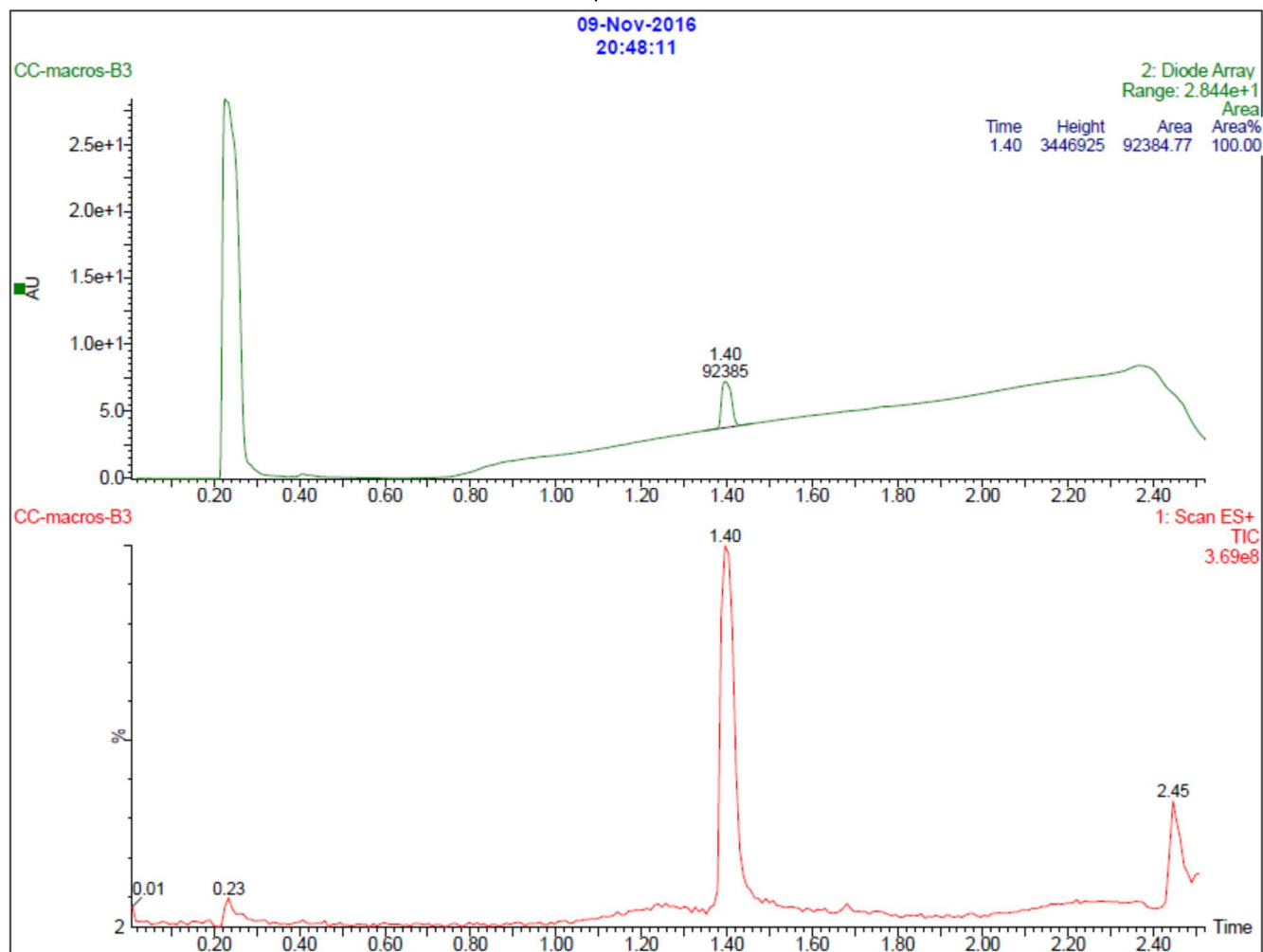
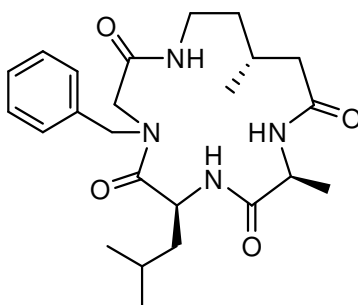
**(3*S*,6*S*,9*S*,13*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,13-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetra-
ne (Ø-3*R*) (44)**



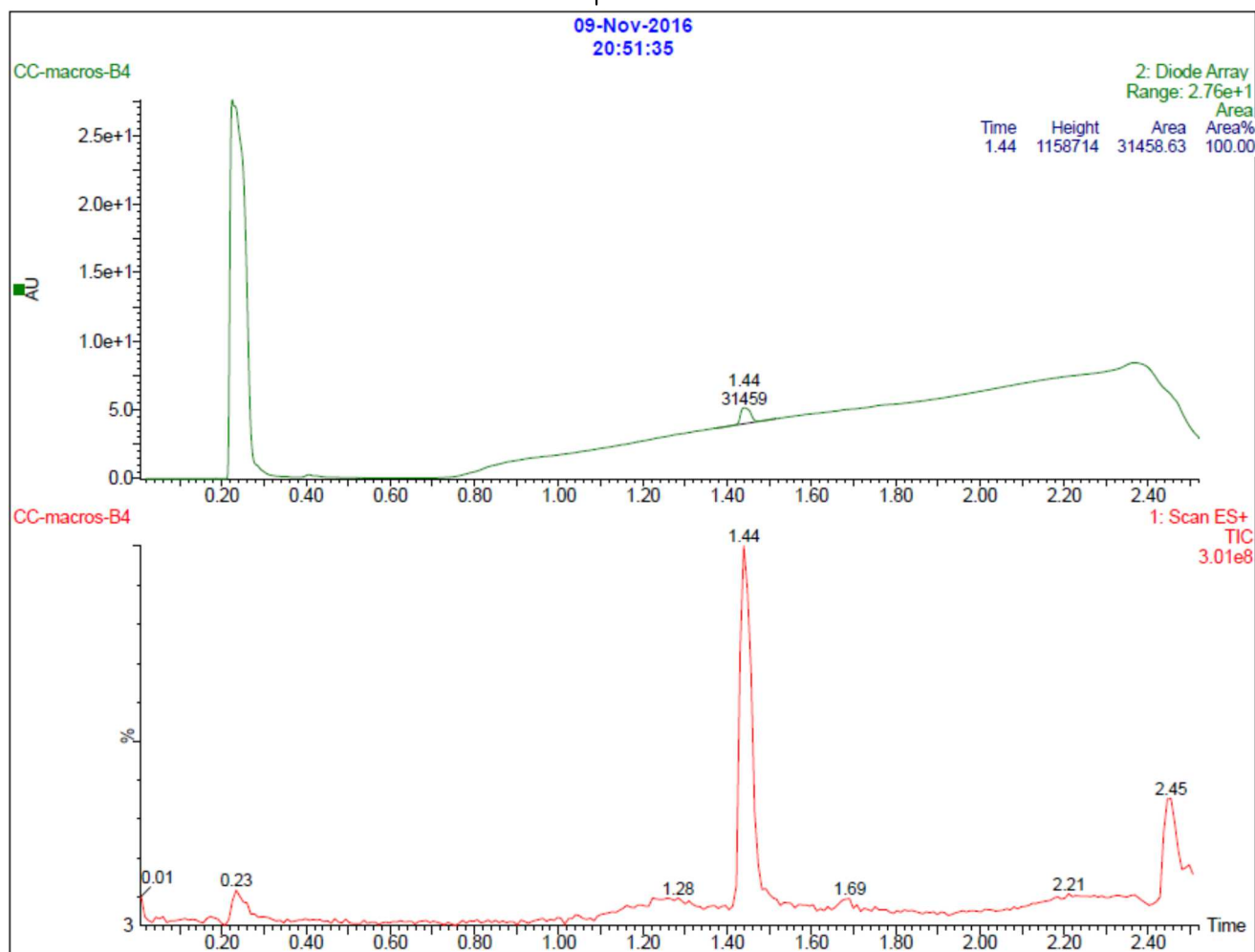
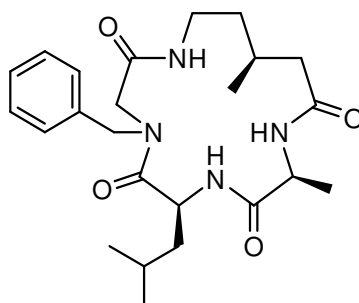
**(3S,6S,9S,13S)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,13-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron
e (Ø-3S) (45)**



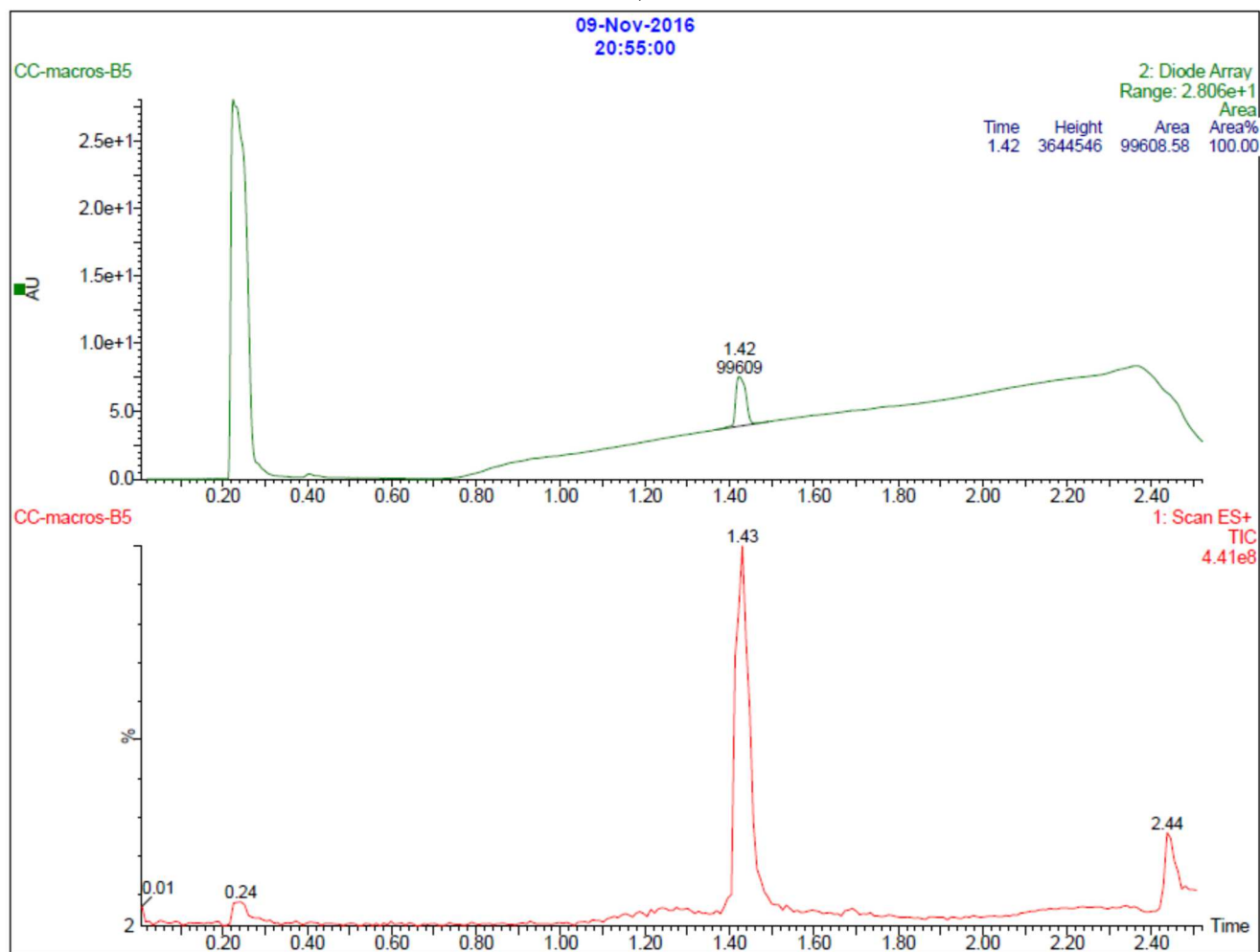
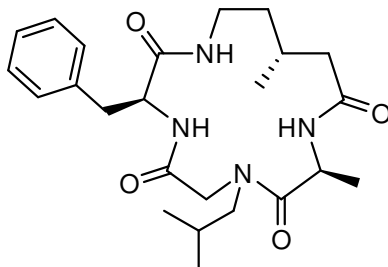
(6*S*,9*S*,13*R*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,13-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nphe-3*R*) (46)



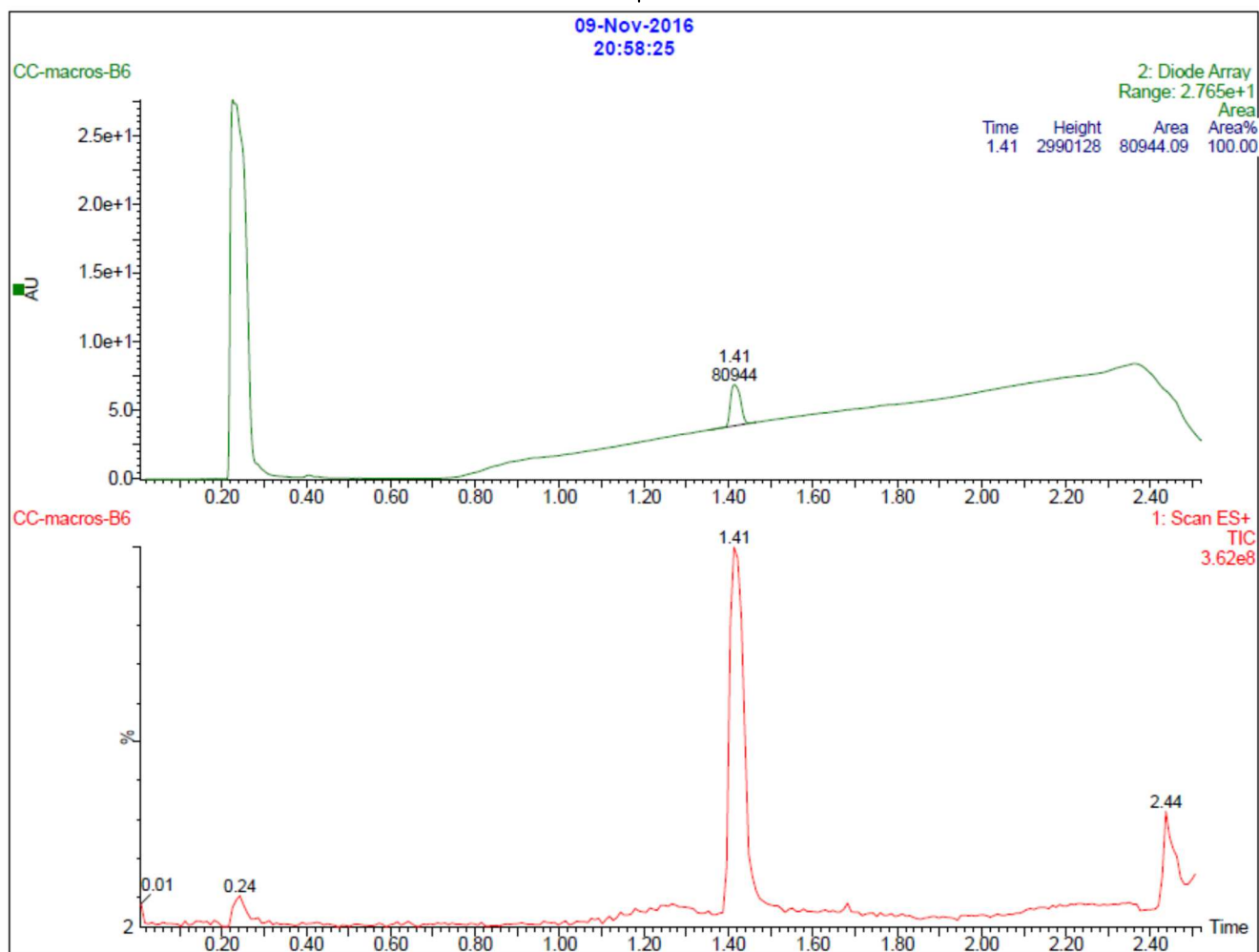
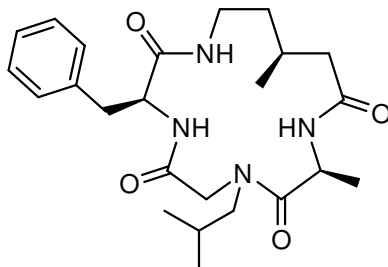
(6*S*,9*S*,13*S*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,13-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrona (Nphe-3*S*) (47)



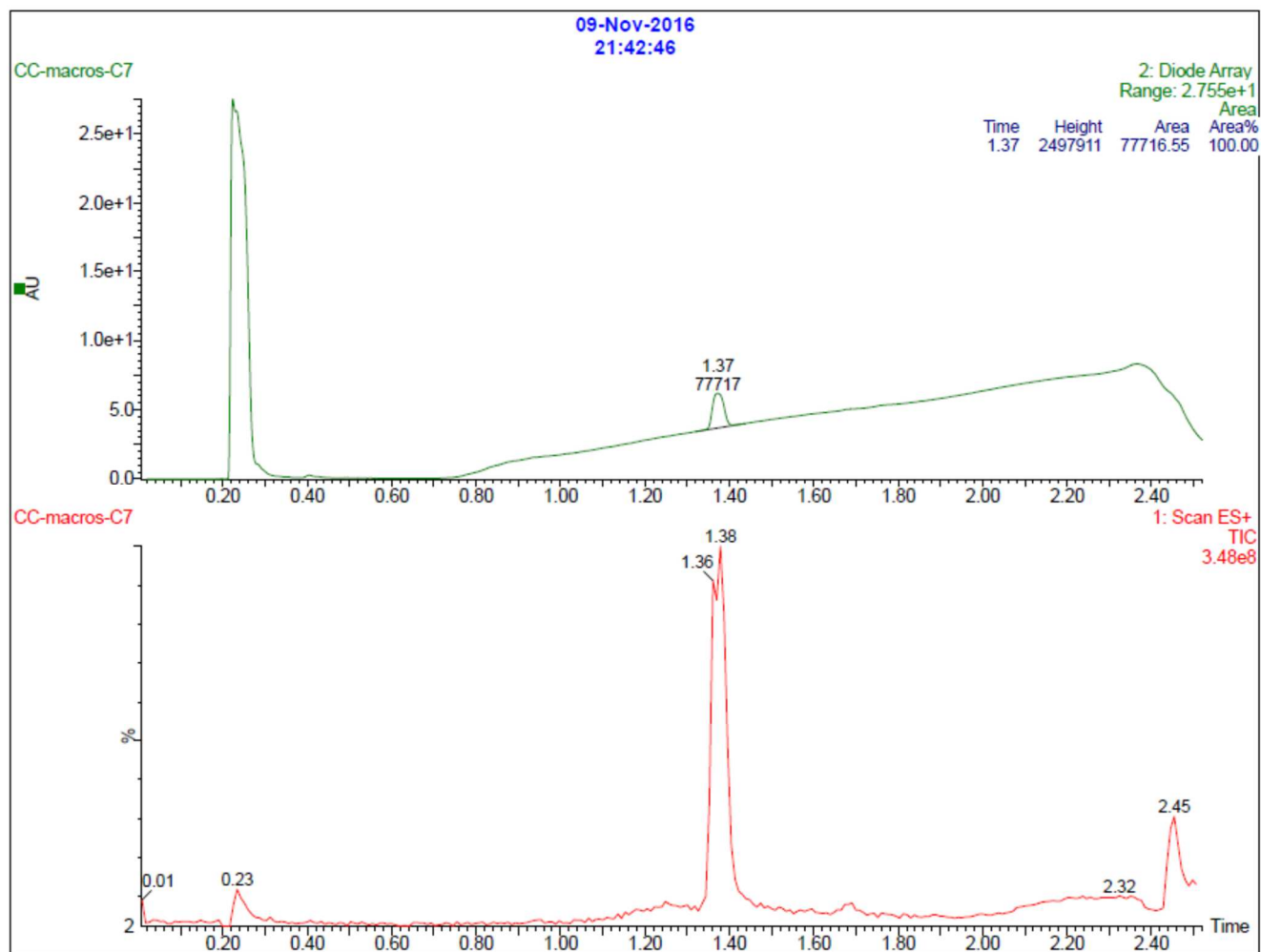
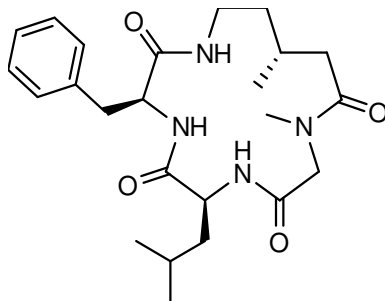
**(3*S*,9*S*,13*R*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,13-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone
(Nleu-3*R*) (48)**



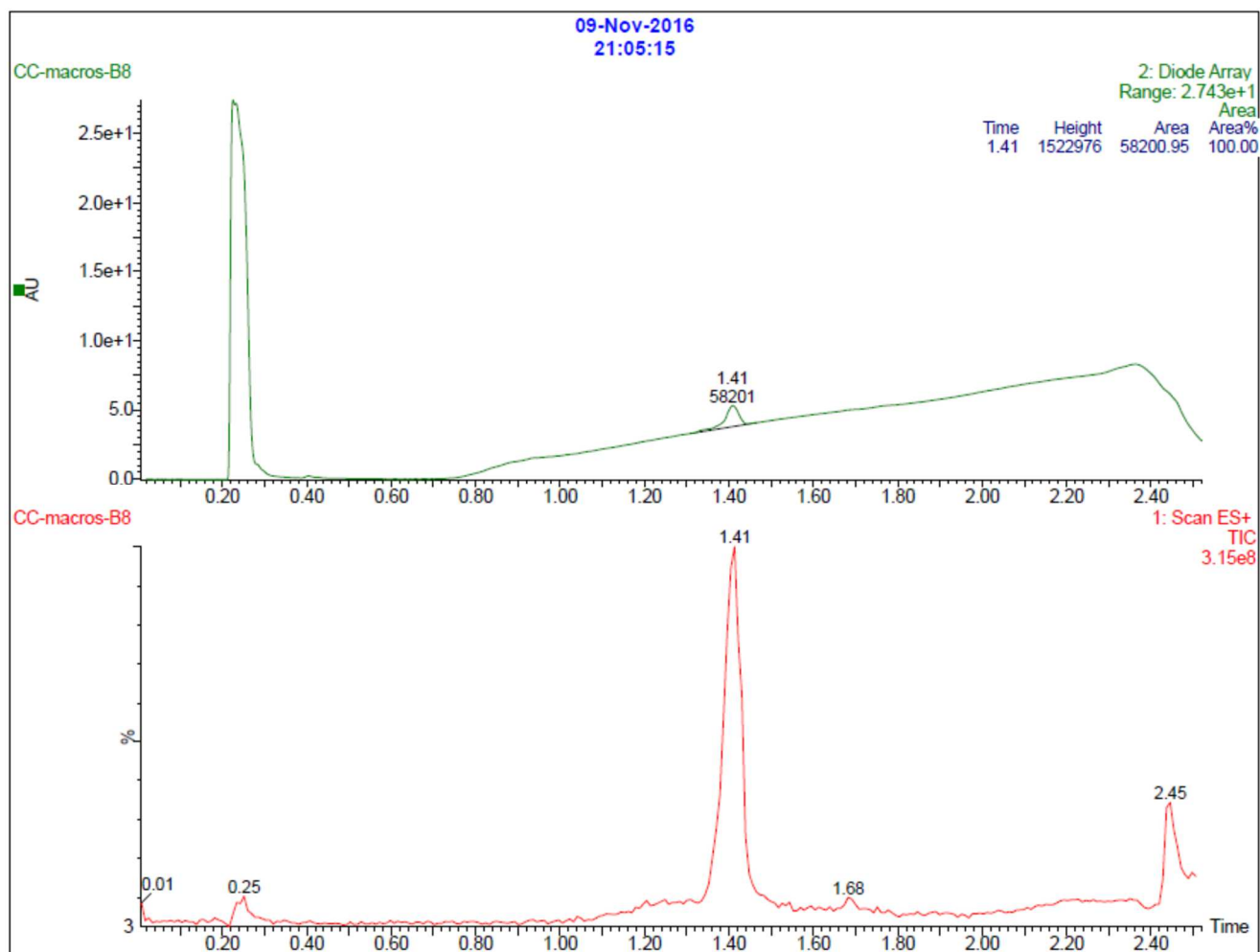
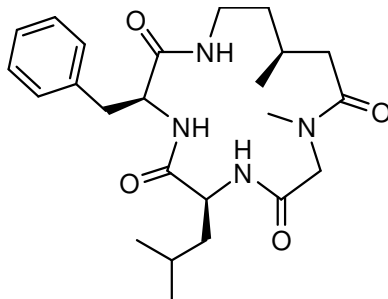
**(3*S*,9*S*,13*S*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,13-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone
(Nleu-3*S*) (49)**



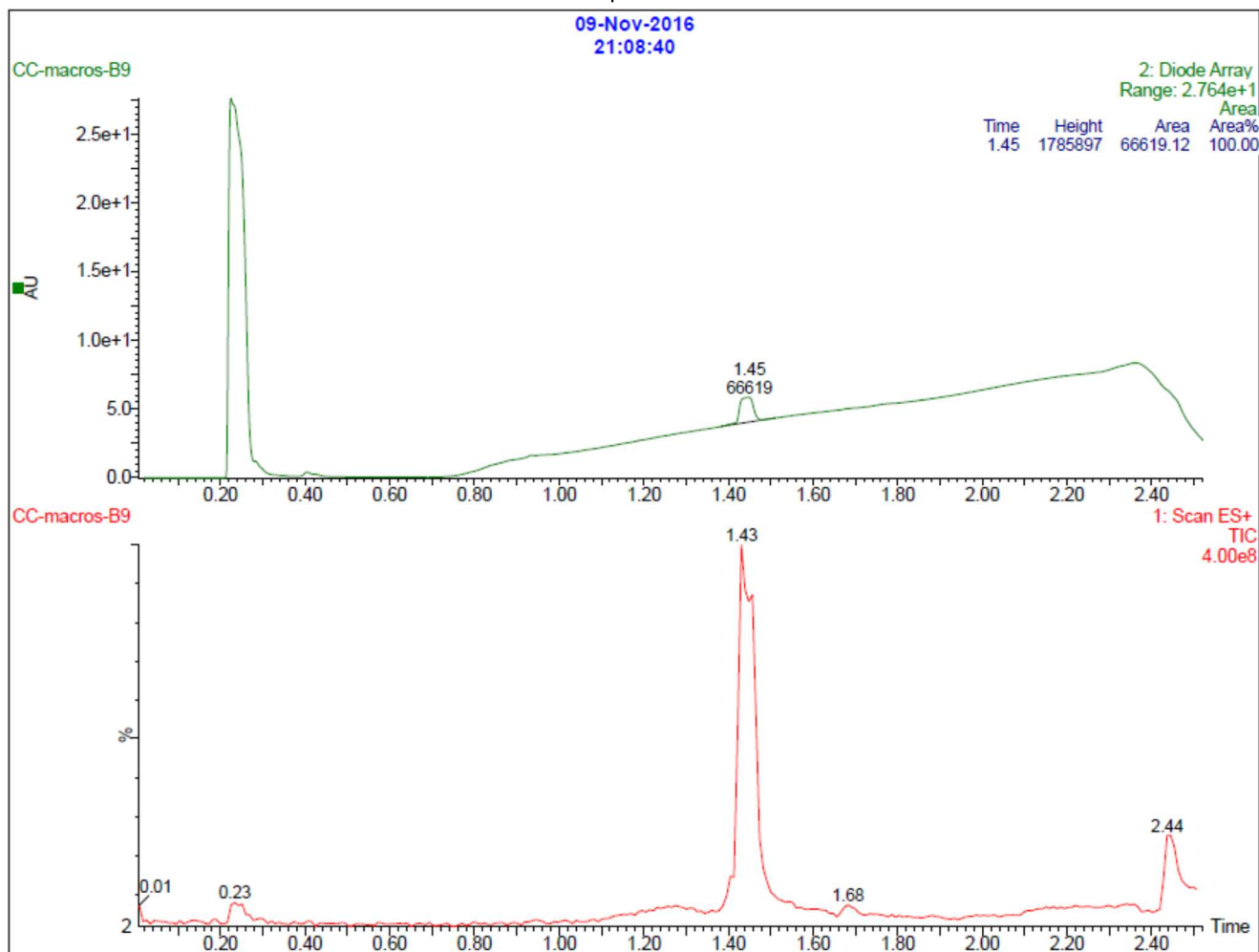
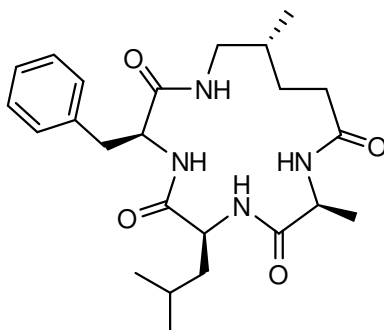
(3*S*,6*S*,13*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-13-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetrone (Nala-3*R*) (50)



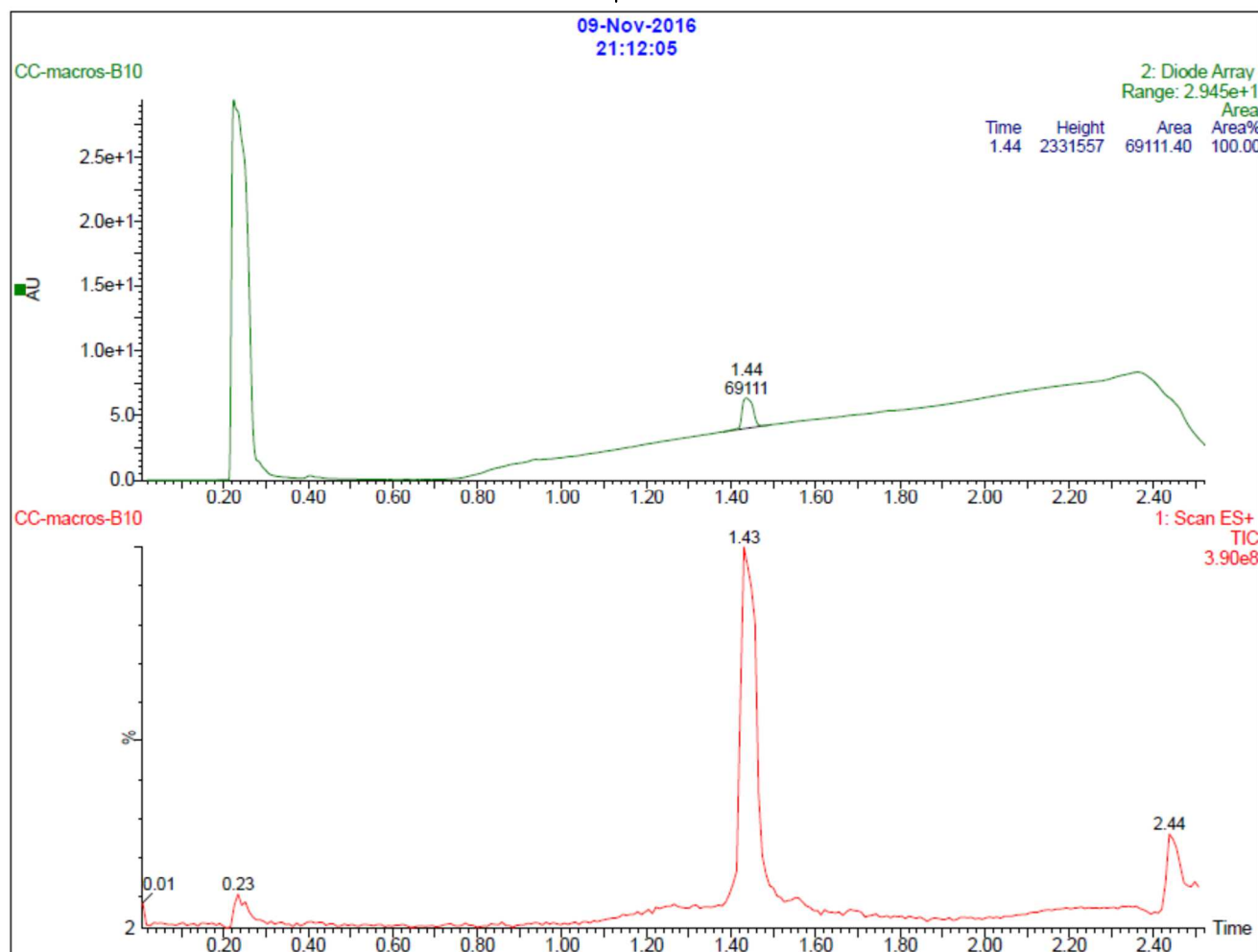
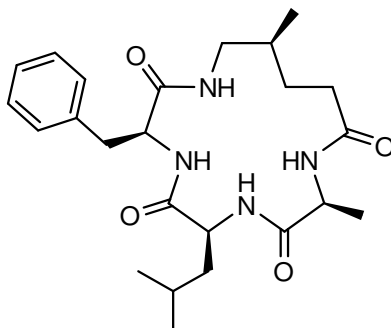
(3*S*,6*S*,13*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-13-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetrone (Nala-3*S*) (51)



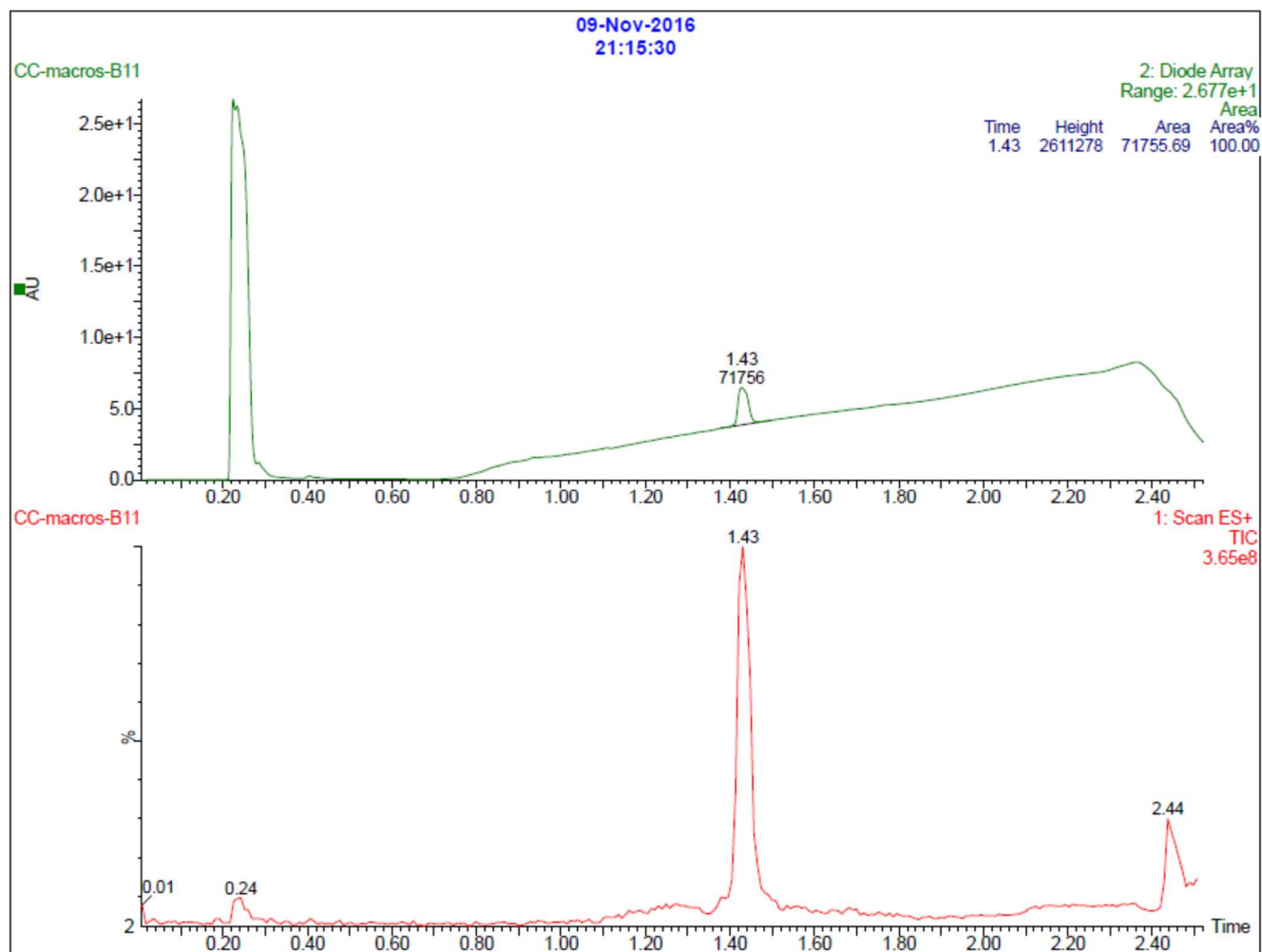
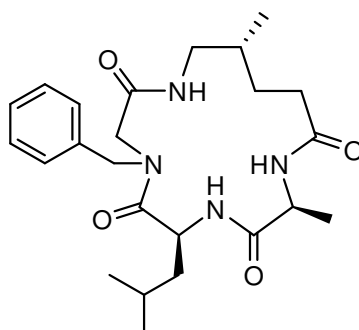
**(3*S*,6*S*,9*S*,14*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,14-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetra-
ne (Ø-4*R*) (52)**



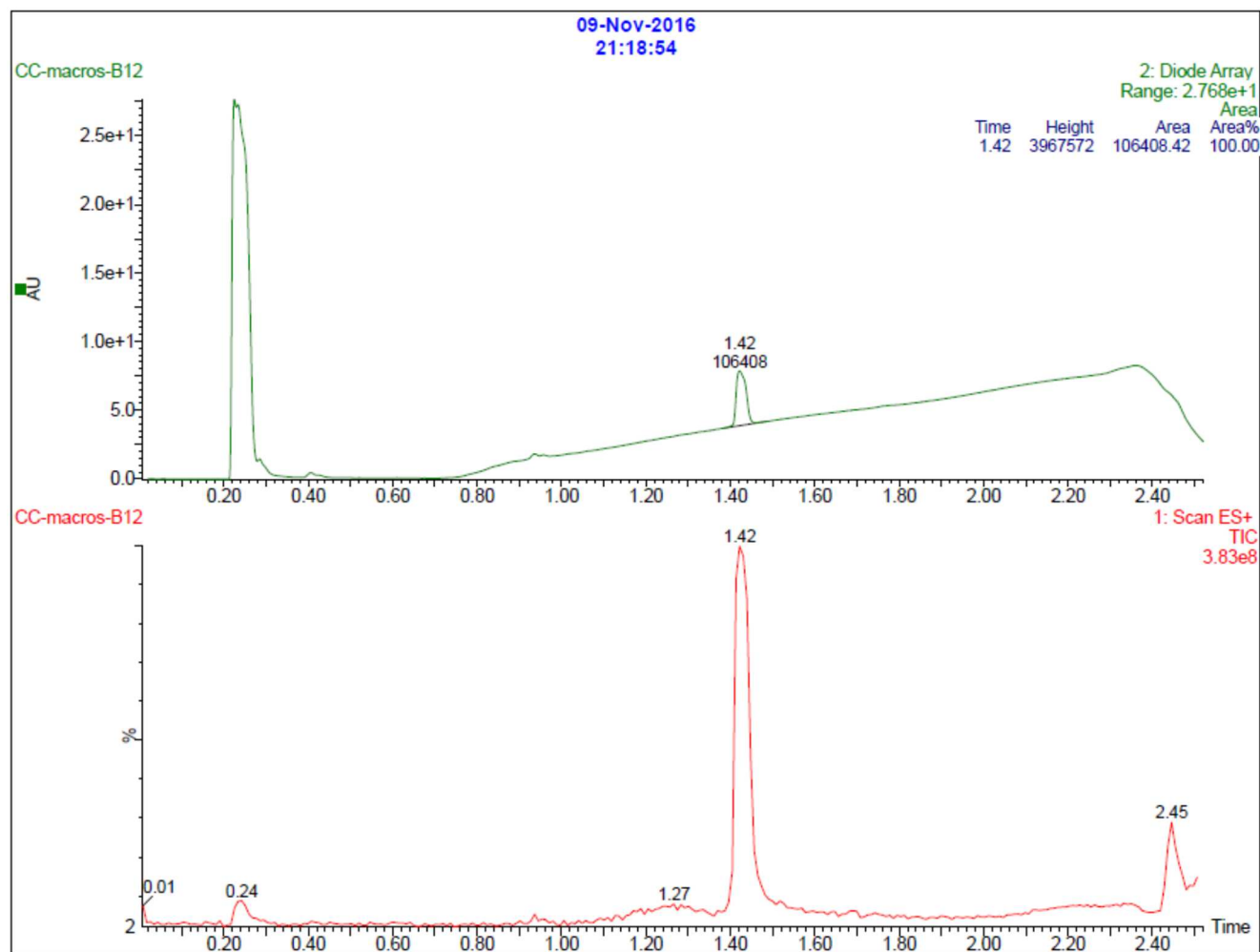
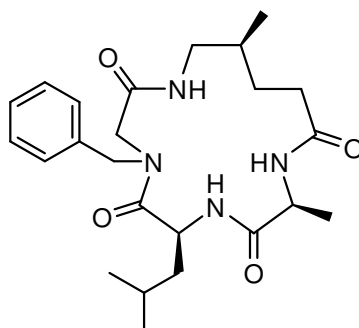
**(3*S*,6*S*,9*S*,14*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,14-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron
e (Ø-4*S*) (53)**



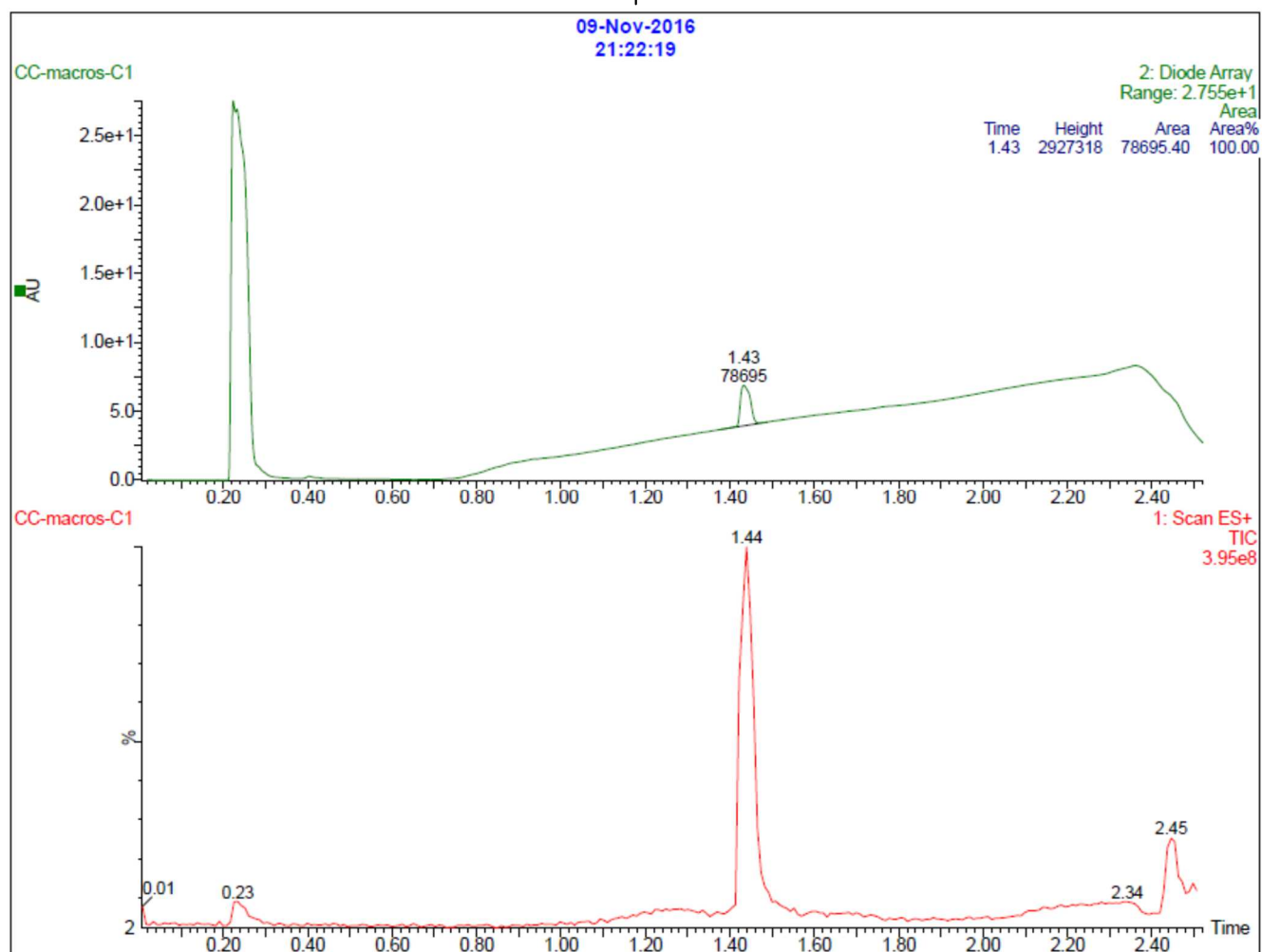
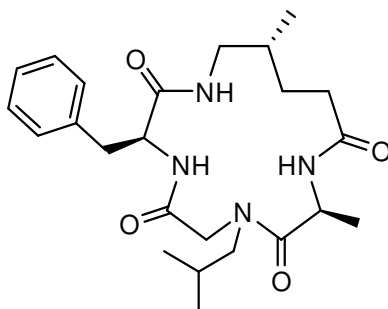
**(6*S*,9*S*,14*R*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,14-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone
(Nphe-4R) (54)**



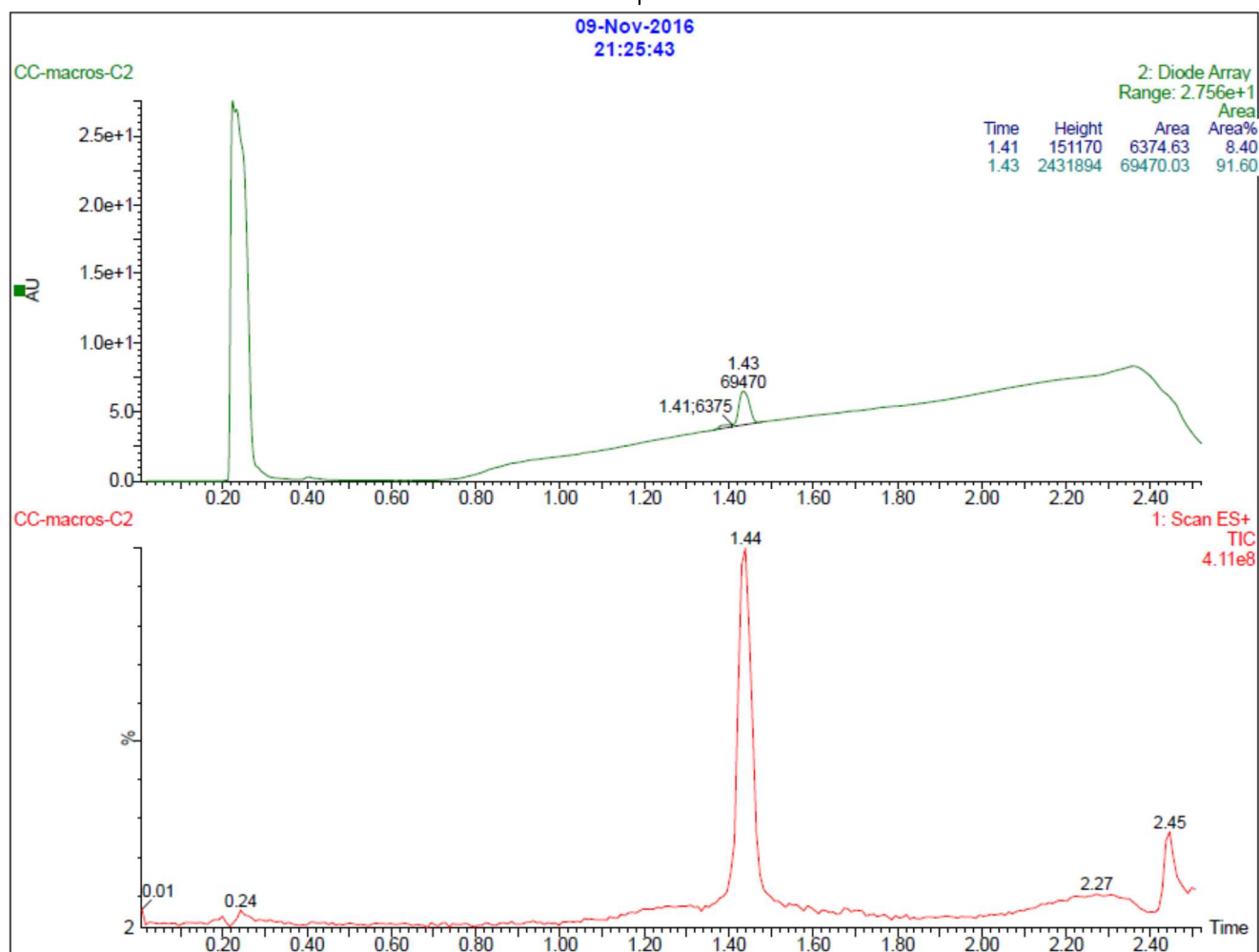
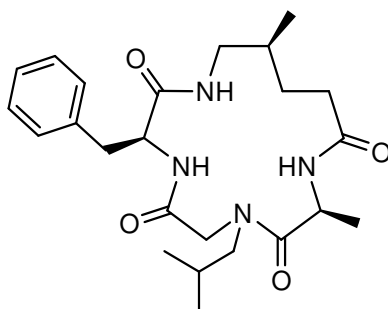
(6*S*,9*S*,14*S*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,14-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrona (Nphe-4*S*) (55)



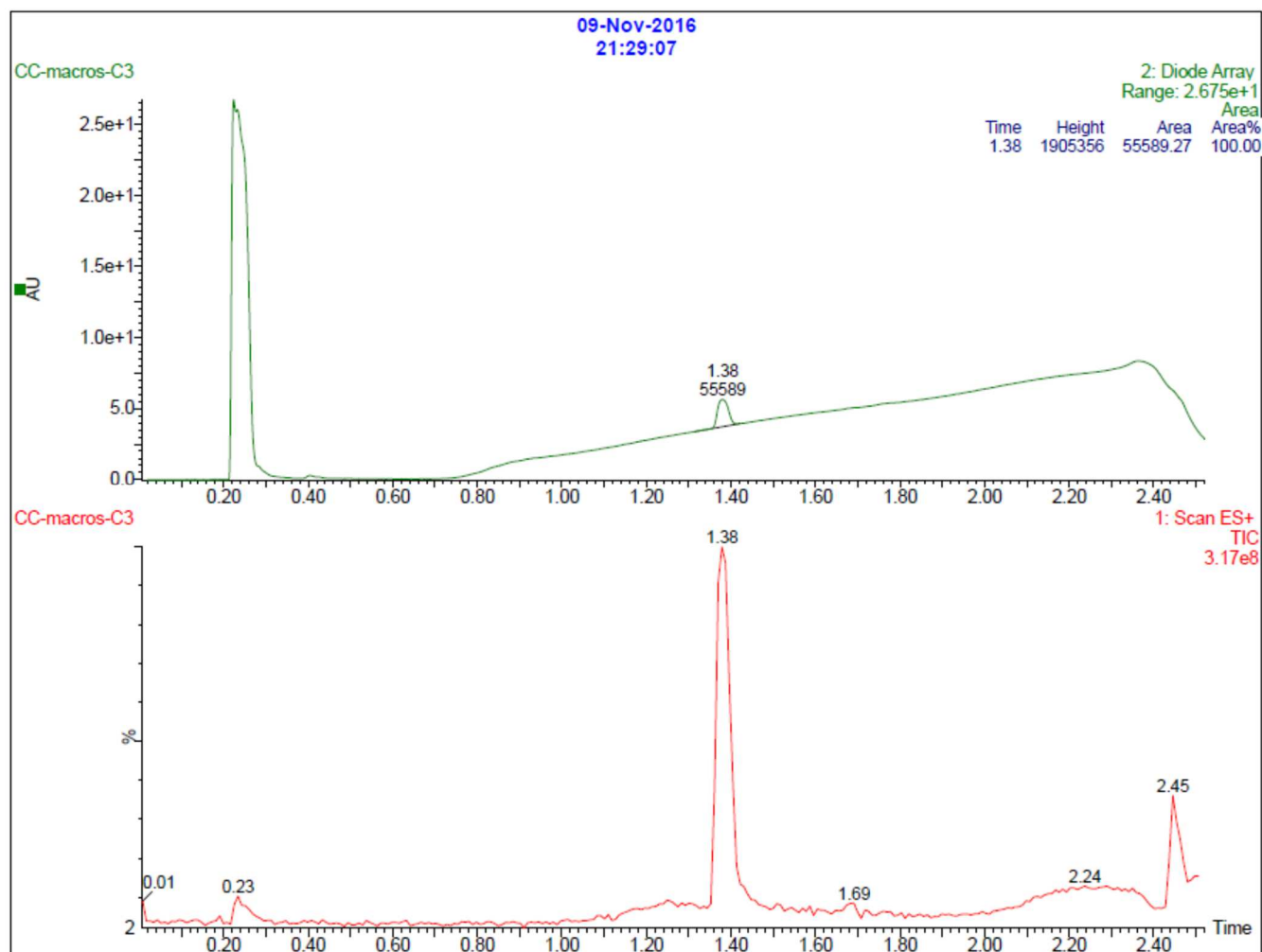
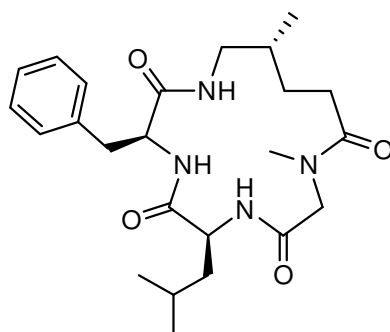
(3*S*,9*S*,14*R*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,14-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nleu-4*R*) (56)



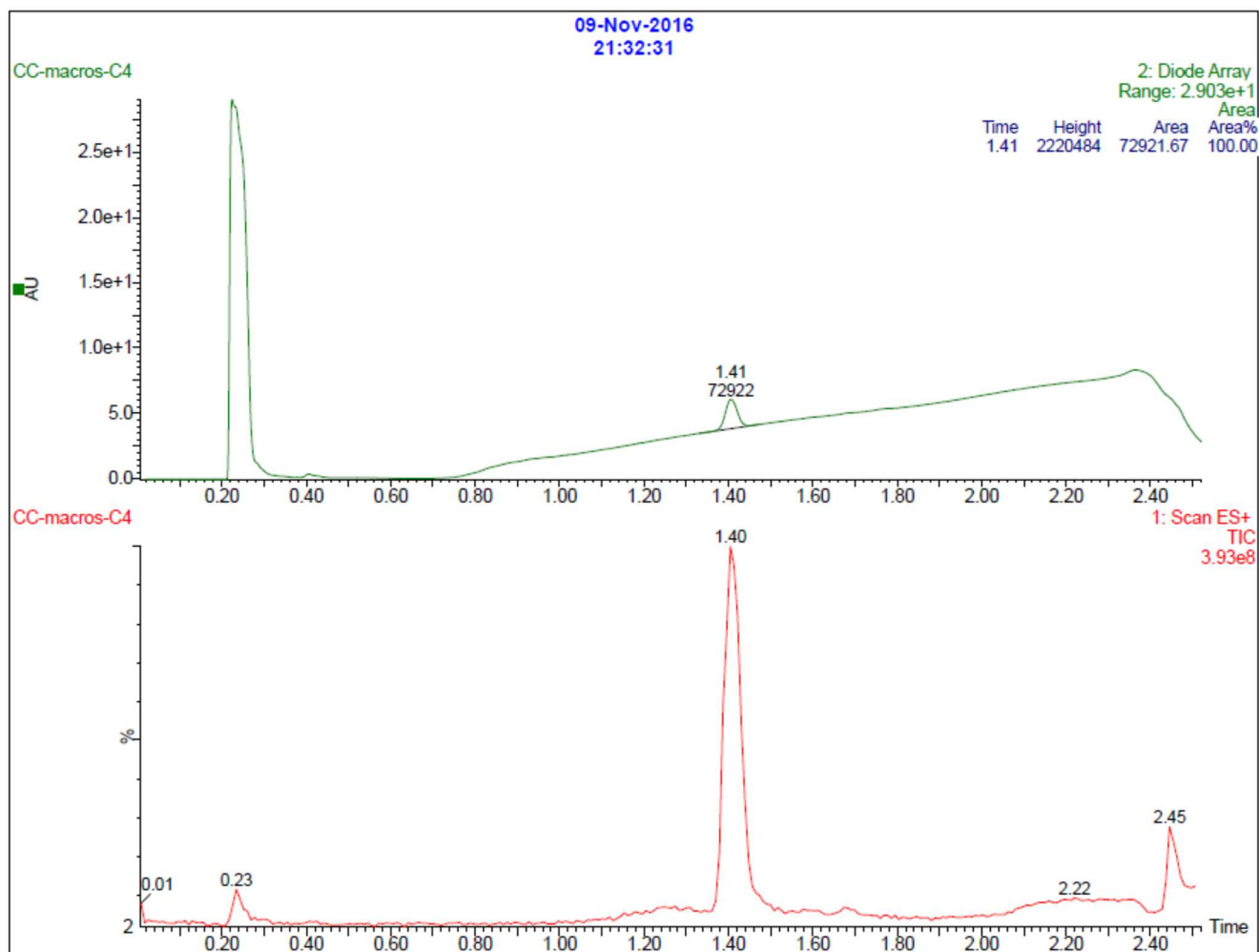
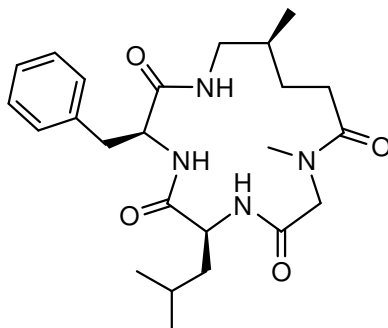
**(3*S*,9*S*,14*S*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,14-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone
(Nleu-4*S*) (57)**



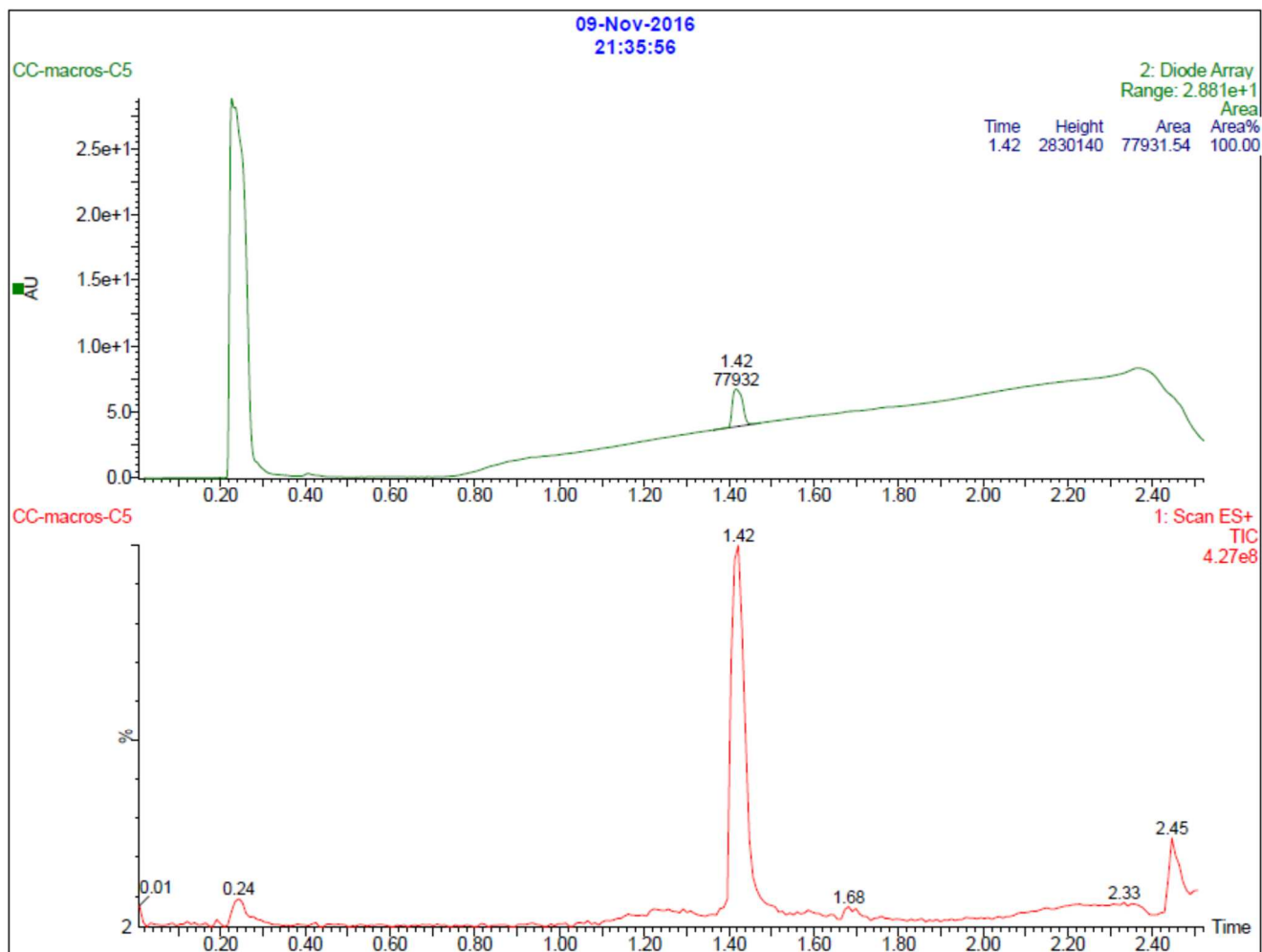
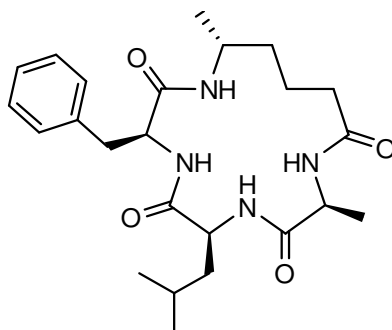
(3*S*,6*S*,14*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-14-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetrone (Nala-4*R*) (58)



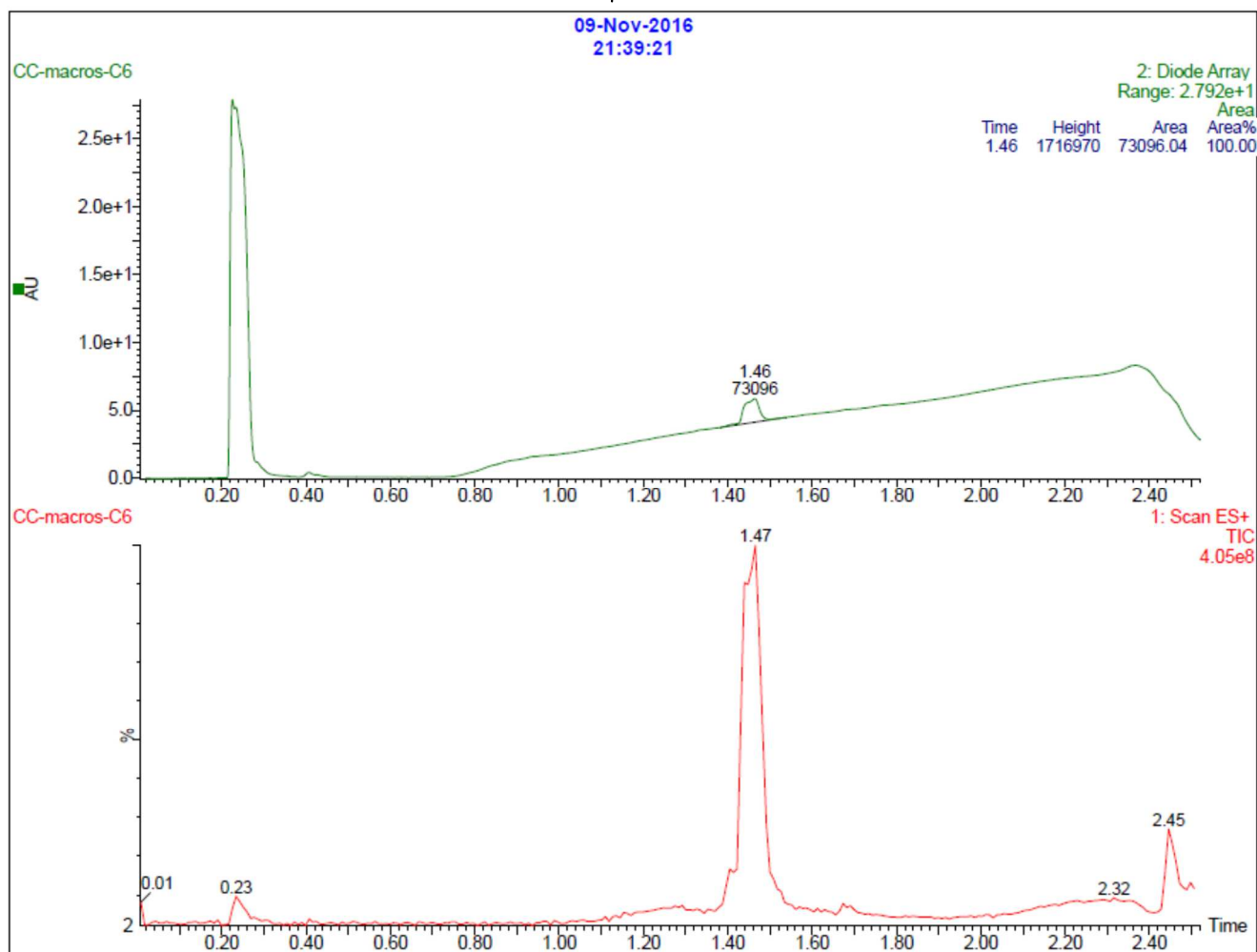
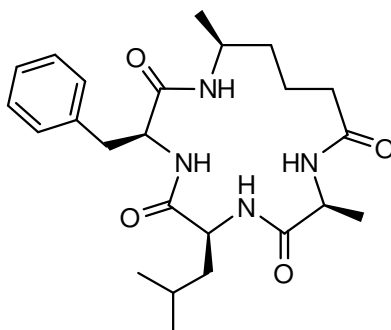
(3*S*,6*S*,14*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-14-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetrone (Nala-4*S*) (59)



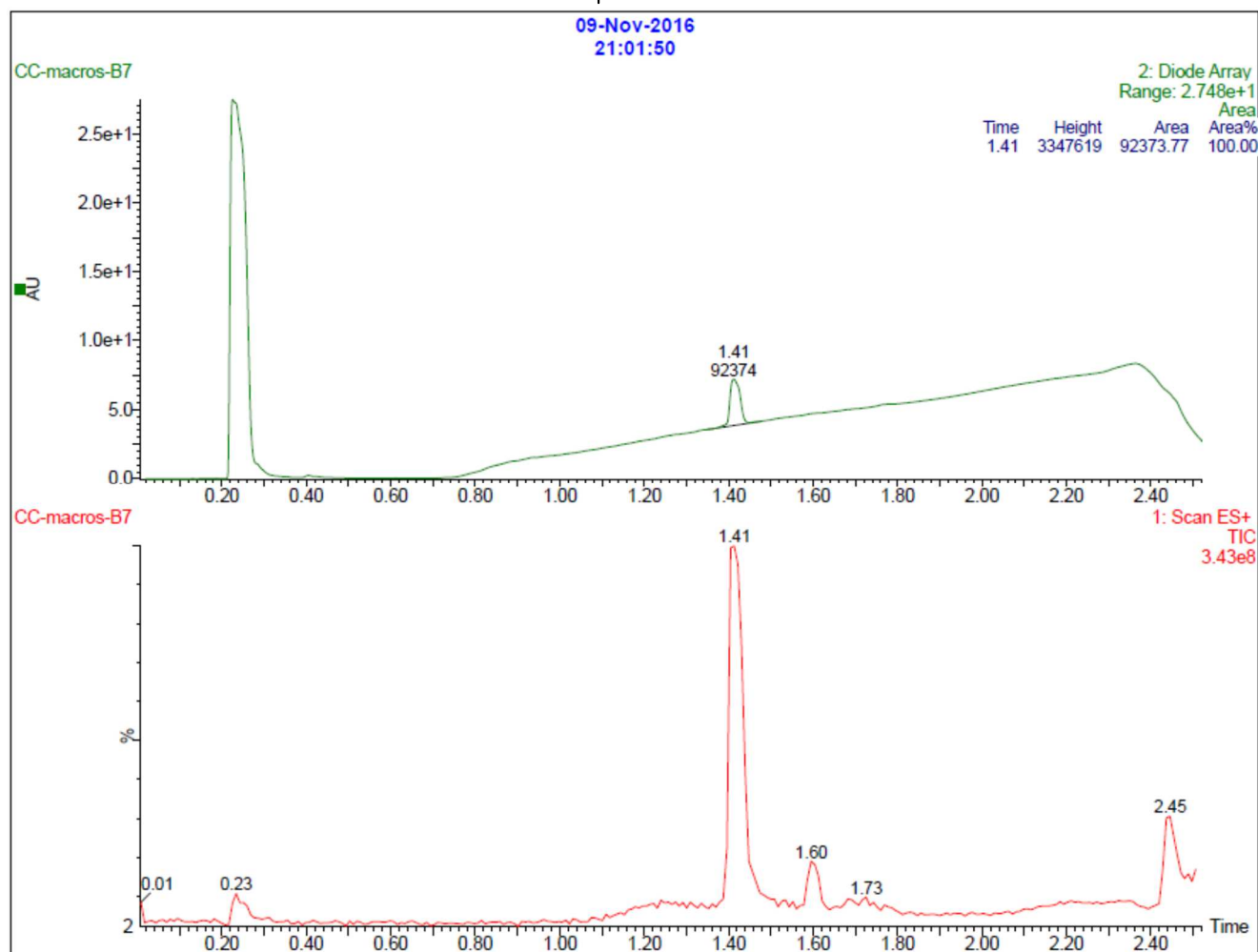
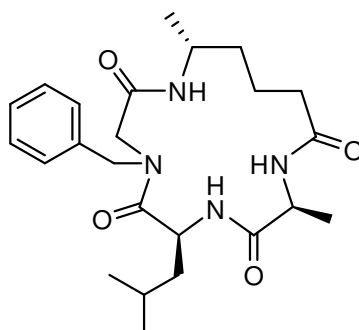
**(3*S*,6*S*,9*S*,15*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetra-
ne (Ø-5*R*) (60)**



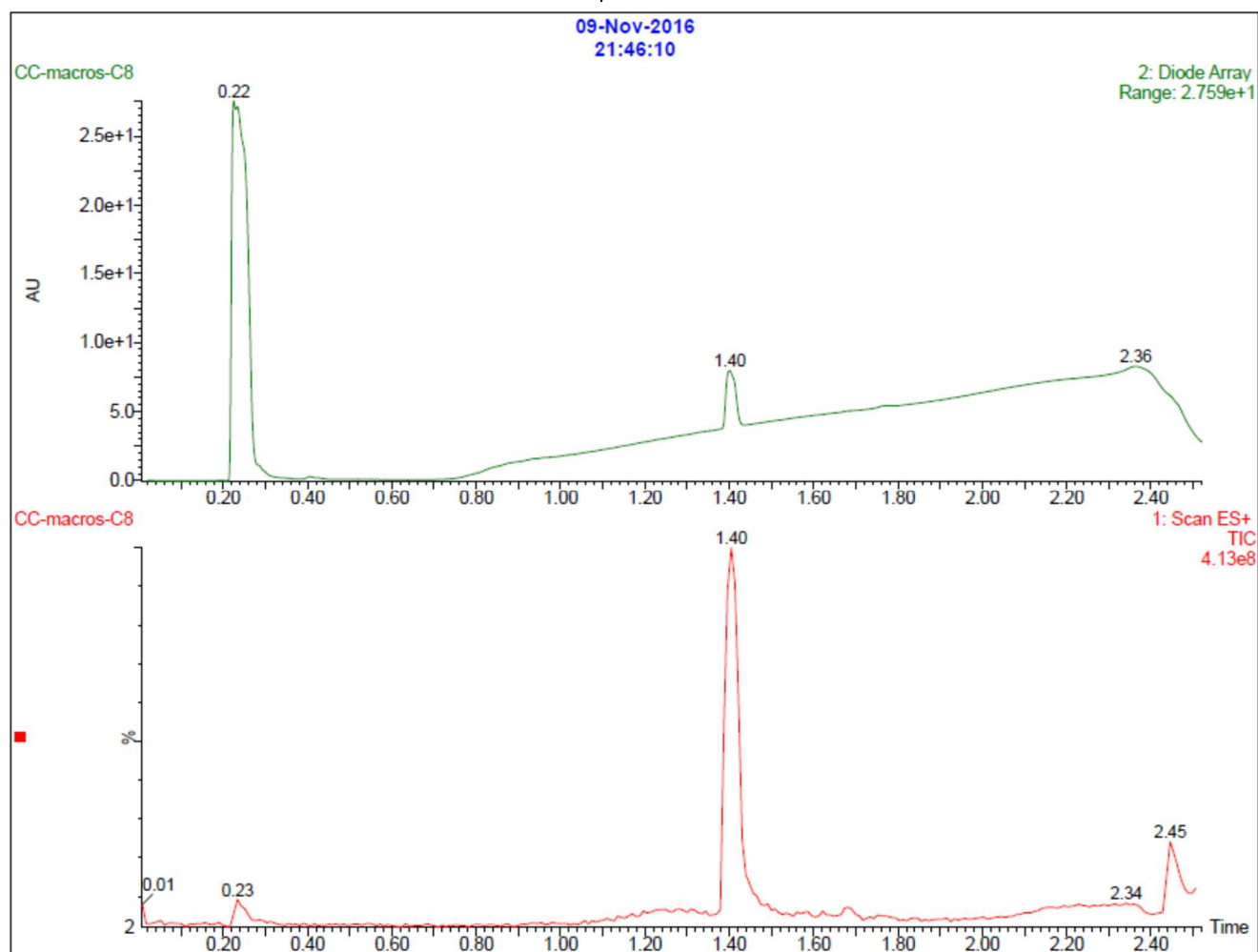
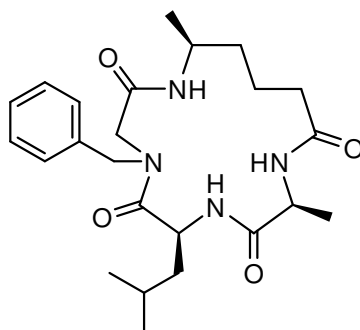
**(3*S*,6*S*,9*S*,15*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetron
e (Ø-5*S*) (61)**



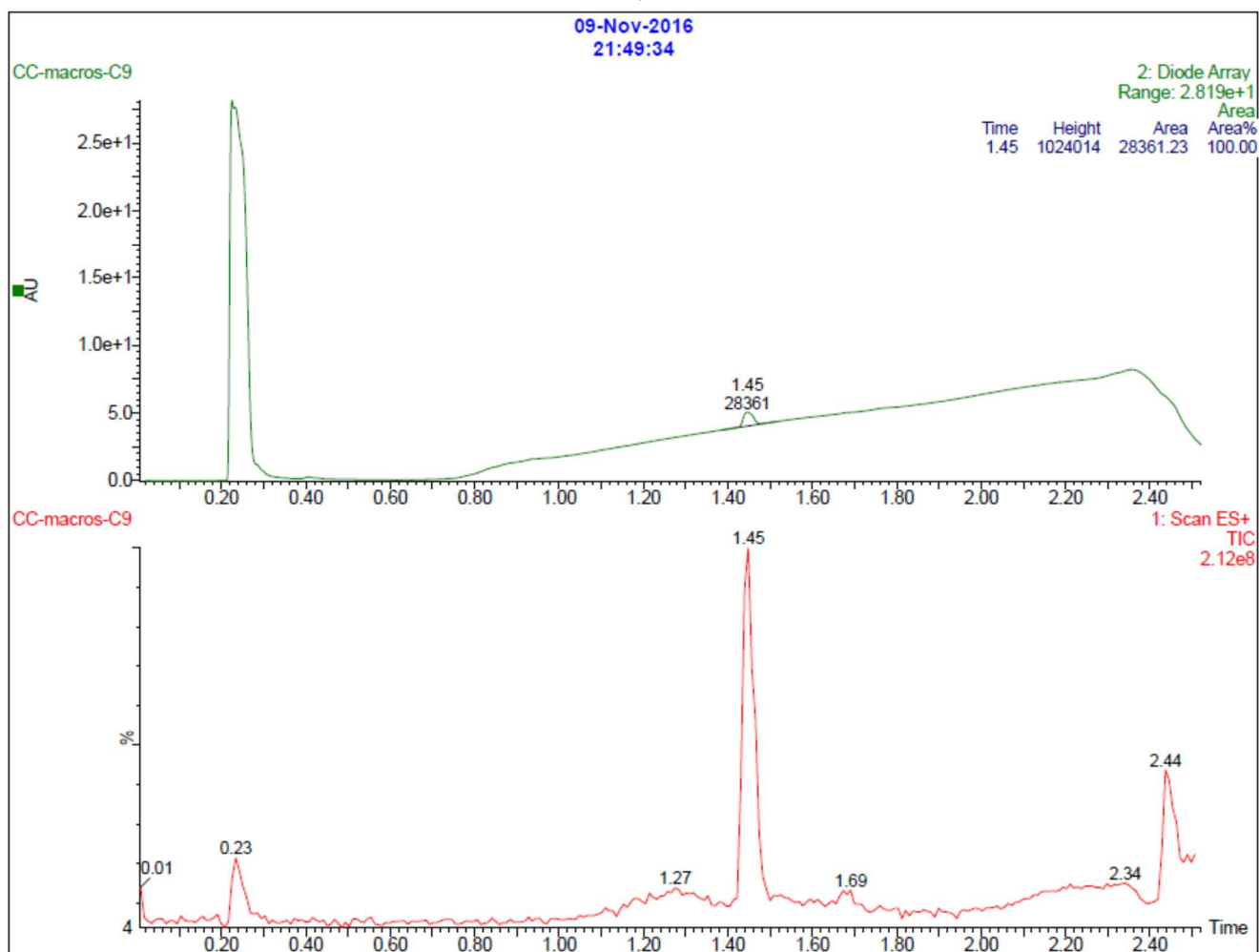
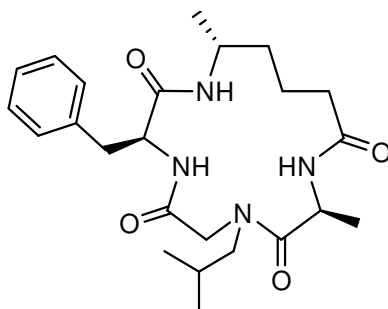
(6*S*,9*S*,15*R*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nphe-5R) (62)



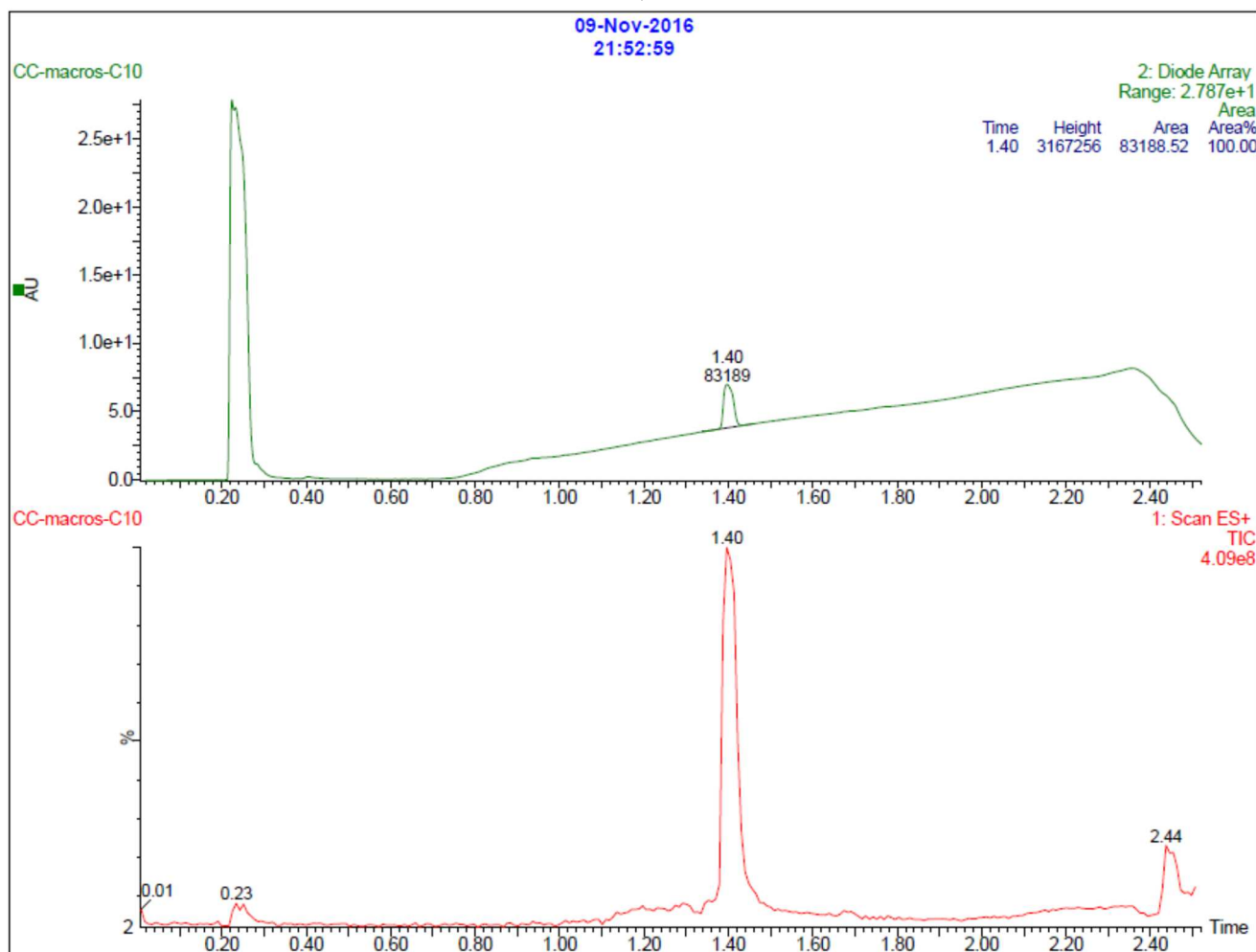
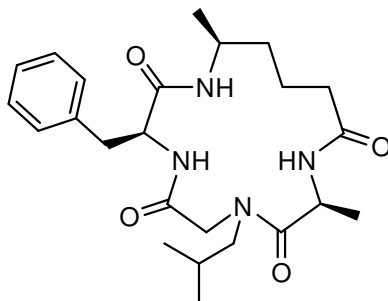
(6*S*,9*S*,15*S*)-4-Benzyl-6-isobutyl-9,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone (Nphe-5*S*) (63)



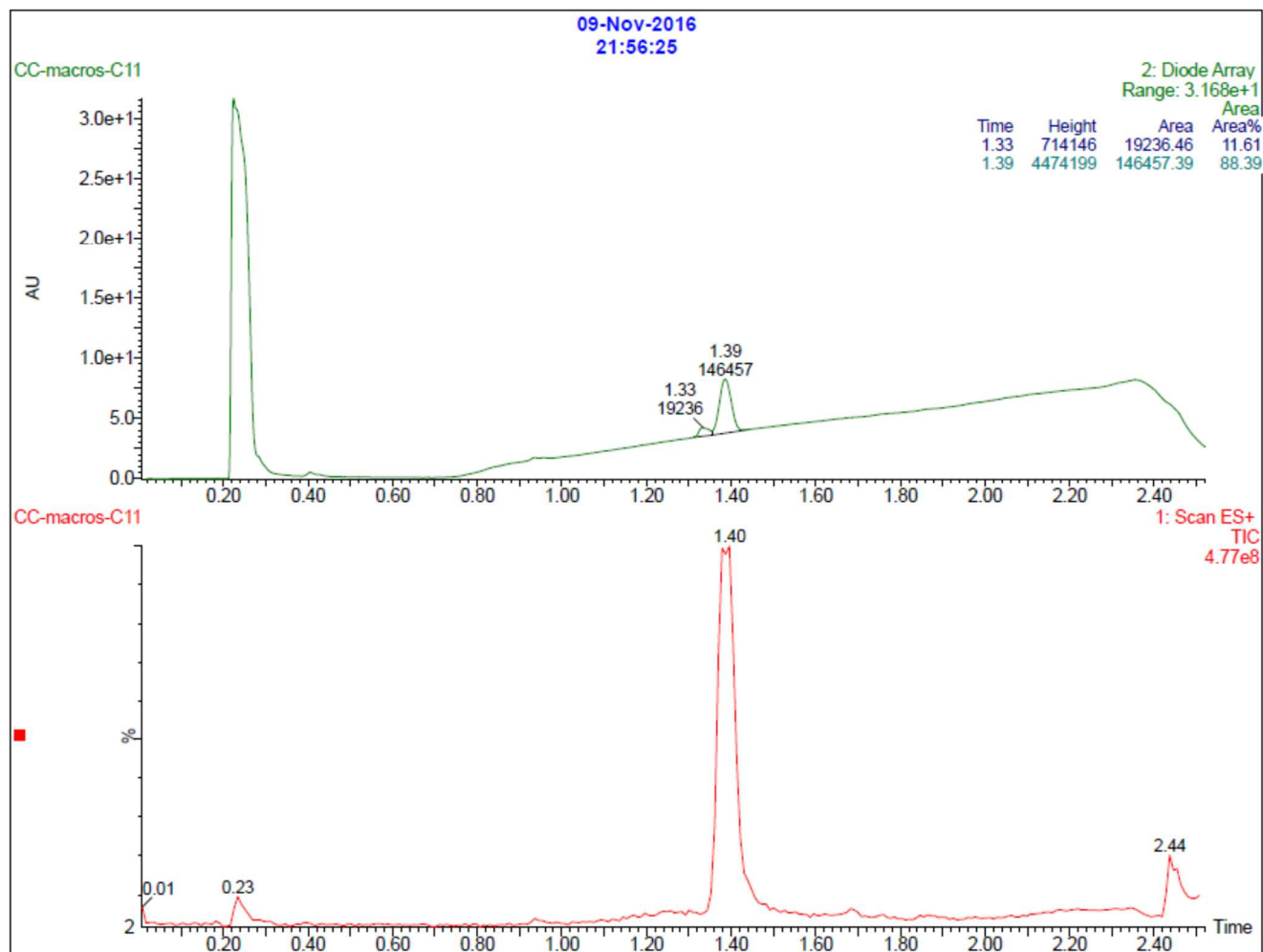
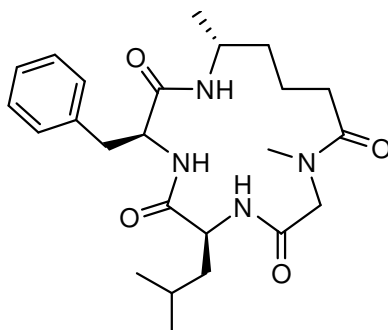
**(3*S*,9*S*,15*R*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone
(Nleu-5R) (64)**



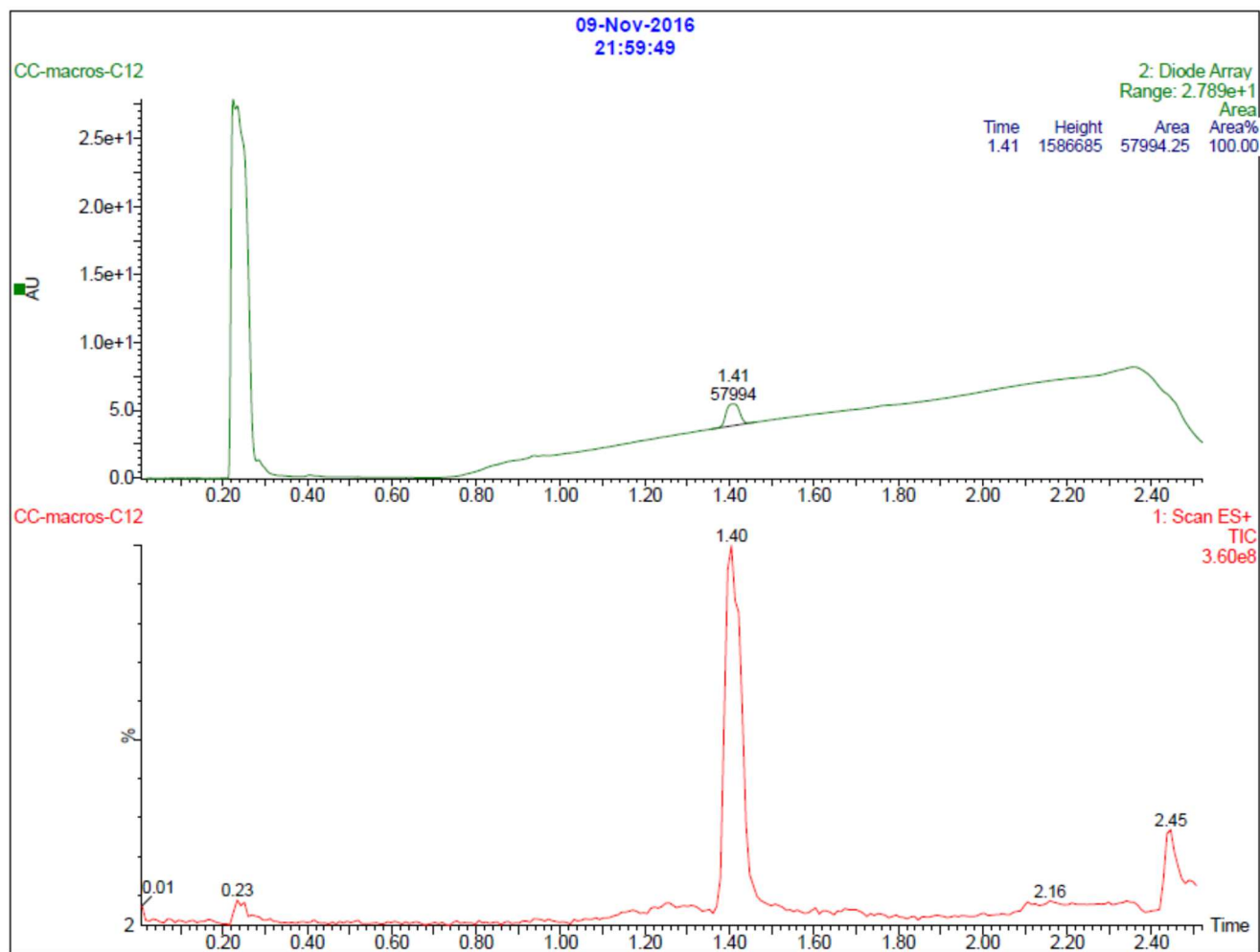
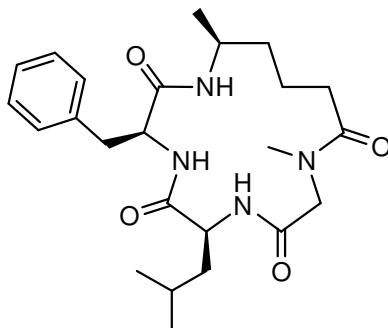
**(3*S*,9*S*,15*S*)-3-Benzyl-7-isobutyl-9,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetetrone
(Nleu-5*S*) (65)**



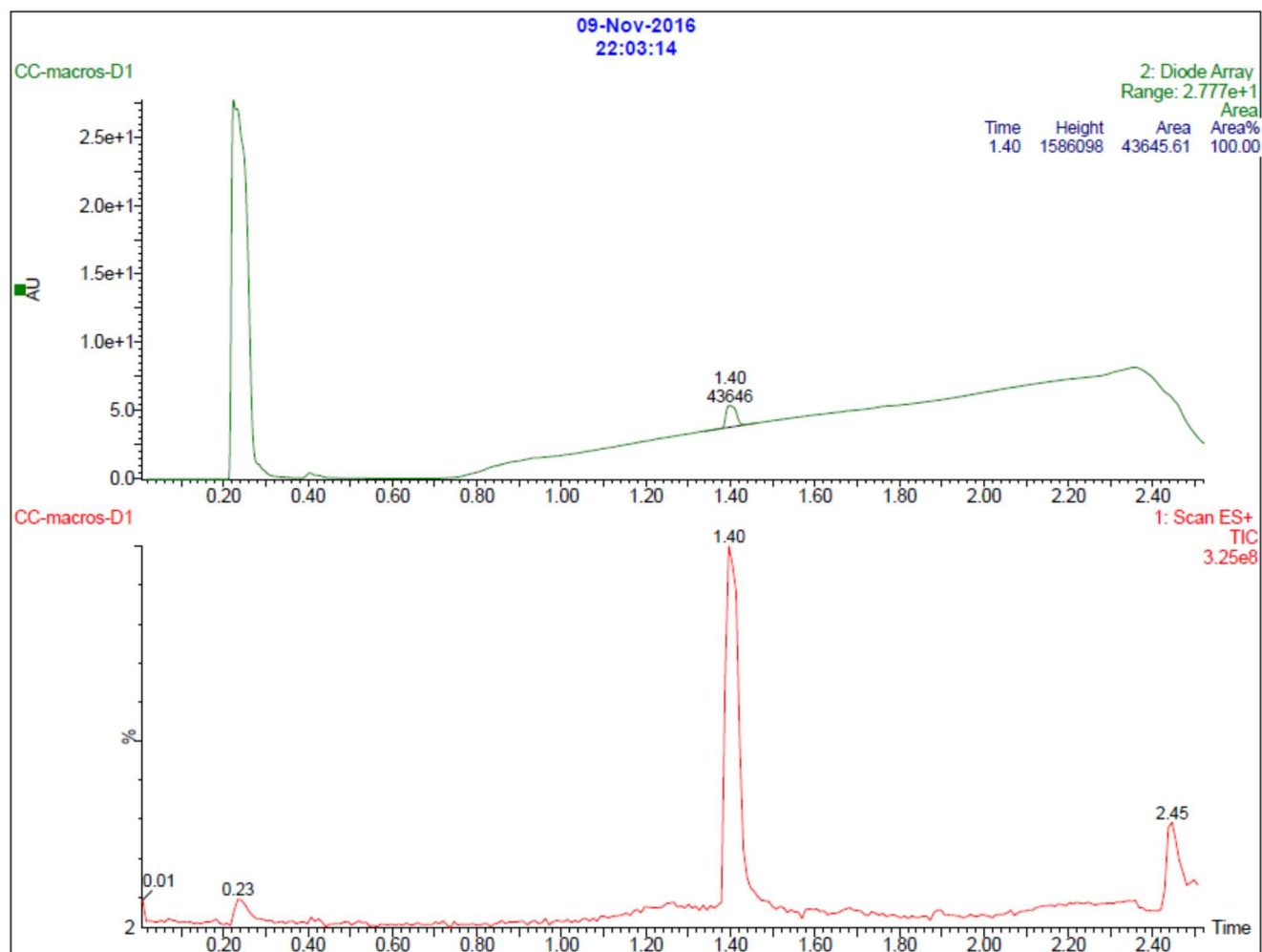
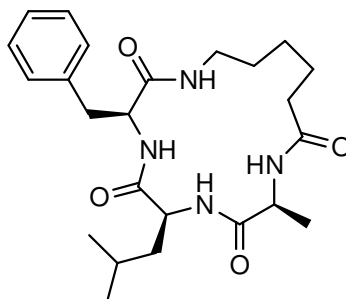
(3*S*,6*S*,15*R*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-15-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetrone (Nala-5R) (66)



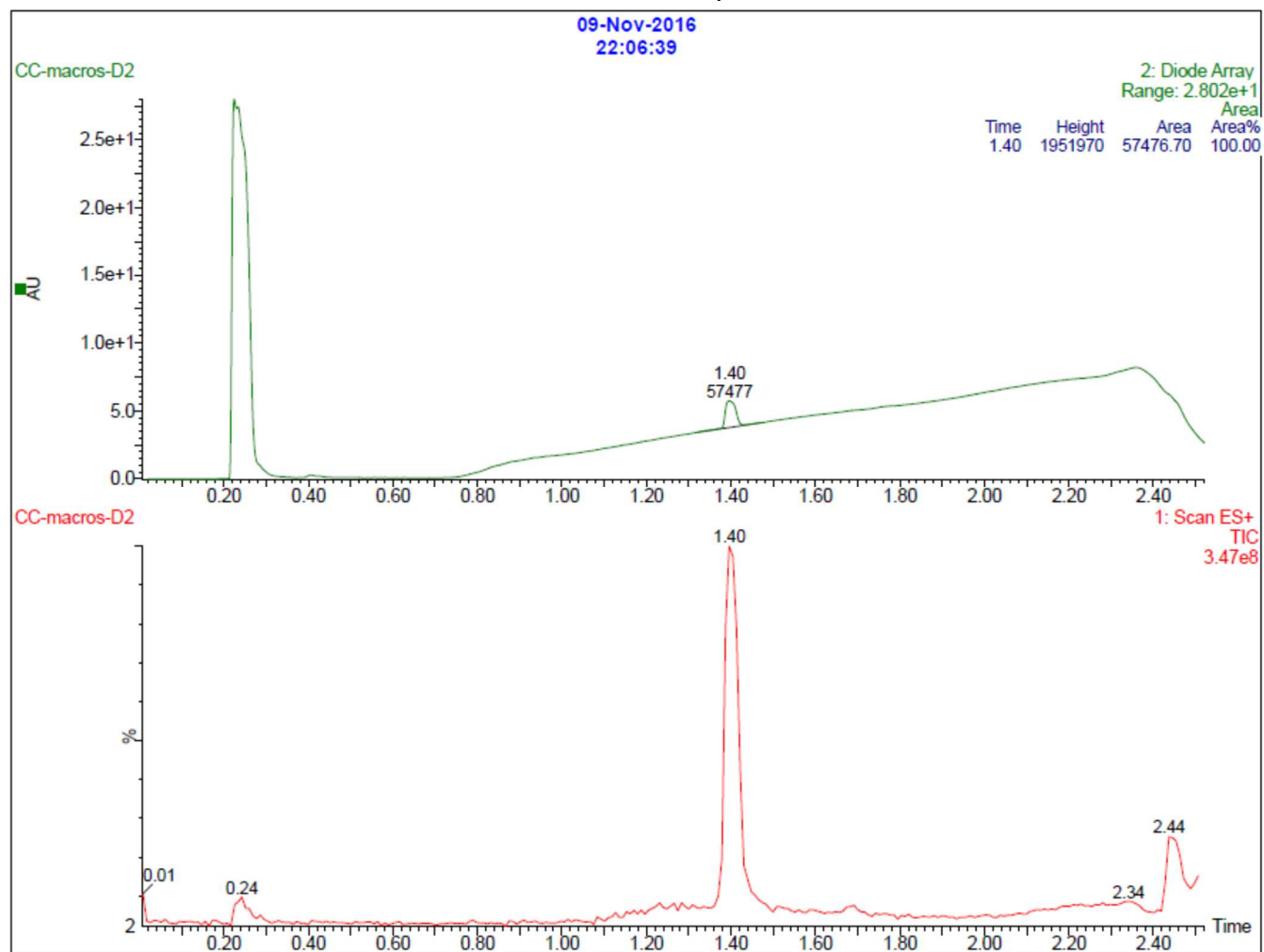
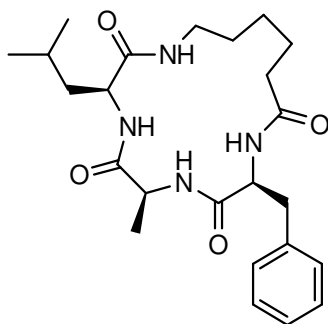
(3*S*,6*S*,15*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-10-methyl-15-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclopentadecanetrone (Nala-5*S*) (67)



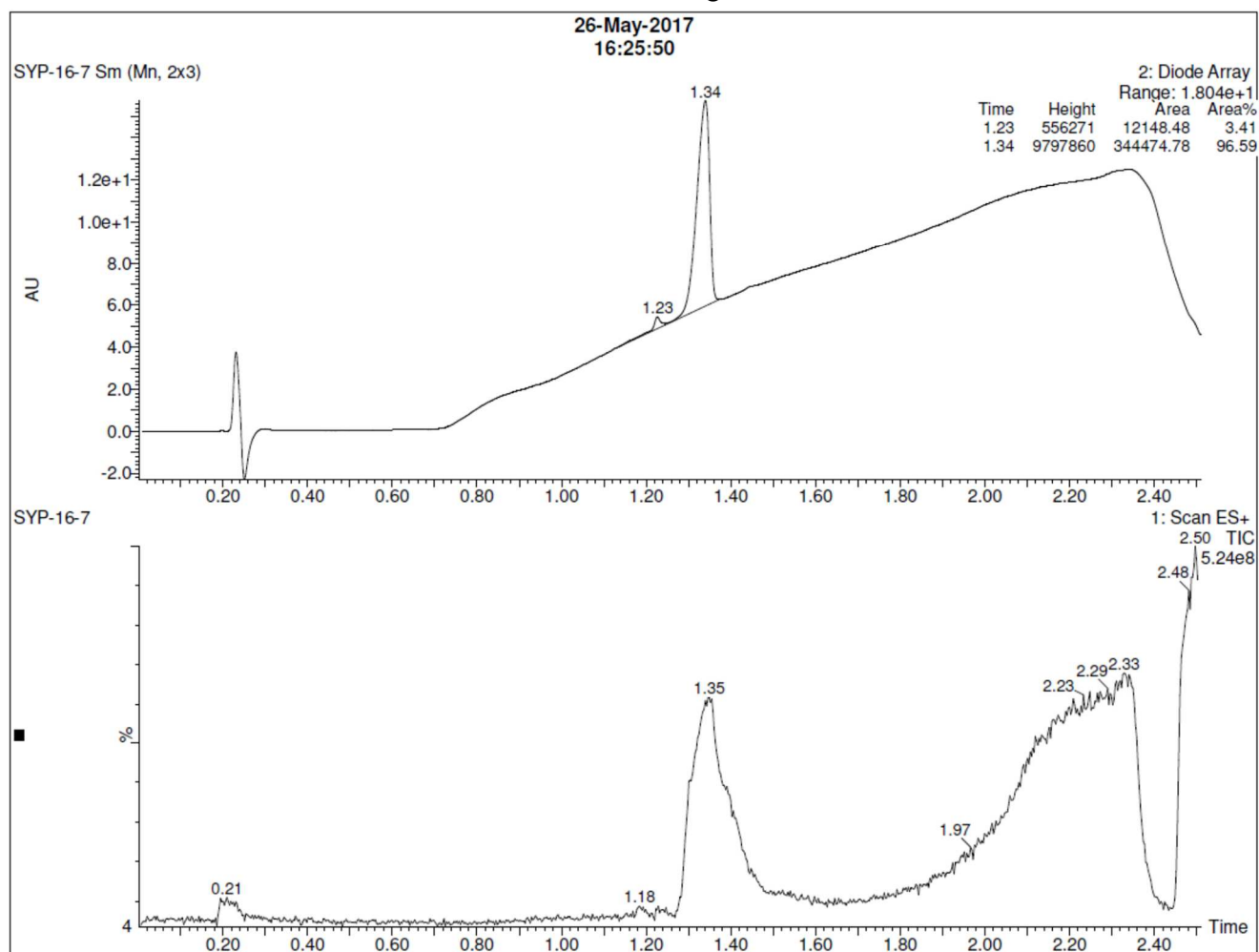
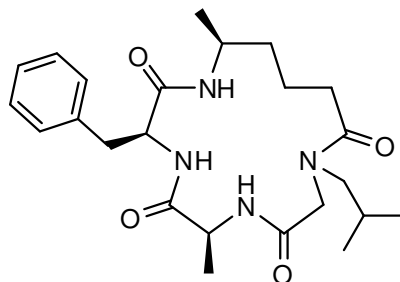
**(3*S*,6*S*,9*S*)-3-Benzyl-6-isobutyl-9-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclohexadecanetetron (reg-6)
(68)**



(3*S*,6*S*,9*S*)-9-Benzyl-3-isobutyl-6-methyl-1,4,7,10-tetraza-2,5,8,11-cyclohexadecanetetron (alt-6)
(69)



(3S,6S,15S)-3-benzyl-10-isobutyl-6,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraazacyclopentadecane-2,5,8,11-tetraone (HypA) (70)



(3S,9S,15S)-3-benzyl-9-isobutyl-7,15-dimethyl-1,4,7,10-tetraazacyclopentadecane-2,5,8,11-tetraone (HypB) (71)

